

**Bedeutung von *Ixodes ricinus* sowie Kleinsäugetern und
Vögeln bei der Verbreitung zeckenassoziierter Pathogene
innerhalb eines Habitates in Mitteldeutschland**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Julia Fritzsch
geboren am 28.10.1984 in Wittenberg

Gutachter

1. Prof. Dr. Eberhard Straube, Jena
2. Prof. Dr. Gert Hein, Bad Kösen
3. Prof. Dr. Enno Jacobs, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03. Dezember 2012

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Mittelwert, Durchschnitt
≙	entspricht
A	Adenin
<i>A.</i>	<i>Anaplasma</i>
Abb.	Abbildung
Access. No	„accession number“
Ad.	Adulte
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>Am.</i>	<i>Amblyomma</i>
<i>Ap.</i>	<i>Apodemus</i>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ARDS	„acute respiratory distress syndrome“, Atemnot-Syndrom des Erwachsenen
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
Aqua dest.	aqua destillata
<i>B.</i>	<i>Babesia</i>
<i>bav.</i>	<i>bavariensis</i>
BLAST	„basic local alignment search tool“
<i>Bo.</i>	<i>Borrelia</i>
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
<i>bur.</i>	<i>burgdorferi</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CRP	C-reaktives Protein
d	„day“, Tag
<i>D.</i>	<i>Dermacentor</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEET	Diethyltoluamid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

d.h.	das heißt
DIC	„disseminated intravascular coagulation“, disseminierte intravasale Gerinnung
<i>div.</i>	<i>divergens</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.</i>	<i>Ehrlichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EID	„emerging infectious diseases“, neu auftretende Infektionskrankheiten
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EP	„emerging pathogens“
et al.	et aliae, und andere
<i>F.</i>	<i>Francisella</i>
FF	Abkürzung für untersuchte Zecke: im Freiland im Frühling gesammelt
FH	Abkürzung für untersuchte Zecke: im Freiland im Herbst gesammelt
FS	Abkürzung für untersuchte Zecke: im Freiland im Sommer gesammelt
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
fw	„forward“, vorwärts
G	Guanin
<i>gar.</i>	<i>garii</i>
<i>gltA</i>	Zitratsynthase-Gen
<i>helv.</i>	<i>helvetica</i>
HGA	Humane granulozytäre Anaplasmosis
HGE	Humane granulozytäre Ehrlichiose
HIV	„human immunodeficiency virus“, menschliches Immunschwäche-Virus
HME	Humane monozytäre Ehrlichiose
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IFT	Immun-Fluoreszenz-Test
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Inf.	Infektion(en)
Infest.	Infestation

i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
KKHF	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber
Koinf.	Koinfektion(en)
La	Larve(n)
<i>M.</i>	<i>Myodes</i>
MF	Abkürzung für untersuchte Zecke: einem Kleinsäuger im Frühling entnommen
MH	Abkürzung für untersuchte Zecke: einem Kleinsäuger im Herbst entnommen
<i>micr.</i>	<i>microti</i>
Min	Minute
ml	Milliliter
<i>mon.</i>	<i>monacensis</i>
MS	Abkürzung für untersuchte Zecke: einem Kleinsäuger im Sommer entnommen
MSF	„mediterranean spotted fever“, mediterranes Fleckfieber
Msp2	„major surface protein 2“
μ	Mikro (10^{-6})
<i>N.</i>	<i>Neorickettsia</i>
NADPH	die reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
n.i.	nicht identifizierbar
Ny	Nymphe(n)
<i>O.</i>	<i>Orientalis</i>
OmpA	„outer membrane protein A“
OspA	„outer surface protein A“
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
PCR	„polymerase-chain-reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
<i>phag.</i>	<i>phagocytophilum</i>
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
rev.	„reverse“, rückwärts
RFLP	„restriction fragment length polymorphism“, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

RKI	Robert-Koch-Institut
RMSF	„Rocky Mountain spotted fever“
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
rRNA	„ribosomal ribonucleic acid“, ribosomale Ribonukleinsäure
s.	siehe
S.	Seite
sec.	Sekunden
SFG	„spotted fever group“, Fleckfiebergruppe
sog.	so genannt(en)
sp.	species
spp.	species pluralis
s.s.	sensu stricto
<i>SspI</i>	<i>Sphaerotilus</i> sp.
STG	„scrub typhus group“
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Temp.	Temperatur
TG	„typhus group“, Typhusgruppe
TIBOLA	„tick-borne lymphadenopathy“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit(s)
V	Volt
<i>val.</i>	<i>valaisiana</i>
VF	Abkürzung für untersuchte Zecke: einem Vogel im Frühling entnommen
VH	Abkürzung für untersuchte Zecke: einem Vogel im Herbst entnommen
VS	Abkürzung für untersuchte Zecke: einem Vogel im Sommer entnommen
vs.	versus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
-----------------------------------	----------

Inhaltsverzeichnis.....	V
--------------------------------	----------

1. Zusammenfassung.....	1
--------------------------------	----------

2. Literaturübersicht.....	3
-----------------------------------	----------

2.1 Vektor <i>Ixodes ricinus</i>.....	3
--	----------

2.1.1 Morphologie und Taxonomie.....	3
--------------------------------------	---

2.1.2 Wirte und Saugakt.....	4
------------------------------	---

2.1.3 Erregerübertragung und Bedeutung als Vektor.....	5
--	---

2.1.4 Entwicklungszyklus und Reproduktion	7
---	---

2.1.5 Aktivität, Lebensraum und geographische Verbreitung	8
---	---

2.1.6 Prophylaxe	9
------------------------	---

2.2 Erreger.....	10
-------------------------	-----------

2.2.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10
--	----

2.2.1.1 Geschichte und Systematik	10
---	----

2.2.1.2 Morphologie, Entwicklungszyklus und Pathogenese.....	10
--	----

2.2.1.3 Vektoren, Wirtstiere und Übertragung.....	11
---	----

2.2.1.4 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie	12
---	----

2.2.2 <i>Rickettsia</i> spp.	14
-----------------------------------	----

2.2.2.1 Geschichte und Systematik	14
---	----

2.2.2.2 Morphologie, Entwicklungszyklus und Pathogenese.....	15
--	----

2.2.2.3 Vektoren, Wirtstiere und Übertragung.....	15
---	----

2.2.2.4 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie	16
---	----

2.2.3 <i>Babesia</i> spp.	17
--------------------------------	----

2.2.3.1 Geschichte und Systematik	17
---	----

2.2.3.2 Morphologie, Entwicklungszyklus und Pathogenese.....	19
--	----

2.2.3.3 Vektoren, Wirtstiere und Übertragung.....	20
---	----

2.2.3.4 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie	21
---	----

2.2.4	Koinfektionen.....	22
3.	Zielsetzung	24
4.	Material und Methoden	26
4.1	Geräte	26
4.2	Reagenzien, Chemikalien, Pufferlösungen, Enzyme	27
4.3	Untersuchungsgebiet	28
4.4	Das Sammeln der Zecken.....	29
4.5	DNA-Extraktion.....	30
4.6	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	30
4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
4.7.1	Prinzip	31
4.7.2	Erregerspezifische PCR	32
4.7.2.1	PCR <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	33
4.7.2.2	PCR <i>Rickettsia</i> spp.....	34
4.7.2.3	PCR <i>Babesia</i> spp.....	35
4.8	Agarose Gelelektrophorese	36
4.8.1	Prinzip	36
4.9	Restriktion	37
4.9.1	Prinzip	37
4.9.2	Erregerspezifische Restriktion	37
4.9.2.1	Restriktion <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	38
4.9.2.2	Restriktion <i>Rickettsia</i> spp.....	38
4.9.2.3	Restriktion <i>Babesia</i> spp.....	39
4.10	Sequenzierung.....	39
4.11	Statistik.....	41
4.12	Software.....	42
5.	Ergebnisse	43
5.1	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	43

5.2	Fangzahlen und Gesamtprävalenzen	44
5.3	PCR, RFLP, Sequenzierung	45
5.3.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	45
5.3.2	<i>Rickettsia</i> spp.	47
5.3.3	<i>Babesia</i> spp.	49
5.4	<i>I. ricinus</i> von Vögeln	51
5.4.1	Infestationsrate	51
5.4.2	Infektionen mit Anaplasmen	52
5.4.3	Infektionen mit Rickettsien	53
5.4.4	Infektionen mit Babesien	54
5.5	<i>I. ricinus</i> von Kleinsäugetern	56
5.5.1	Infestationsrate	56
5.5.2	Infektionen mit Anaplasmen	58
5.5.3	Infektionen mit Rickettsien	59
5.5.4	Infektionen mit Babesien	59
5.6	Wirtssuchende <i>I. ricinus</i>	62
5.6.1	Infektionen mit Anaplasmen	62
5.6.2	Infektionen mit Rickettsien	62
5.6.3	Infektionen mit Babesien	62
5.7	Koinfektionen	63
5.7.1	Koinfektionen mit <i>Anaplasma</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., <i>Babesia</i> spp.	63
5.7.2	Koinfektionen mit <i>Borrelia</i> spp. und <i>Francisella tularensis</i>	63
5.8	Prävalenzvergleich	65
5.8.1	Erreger	65
5.8.2	Wirte	72
6.	Diskussion	74
6.1	Der Vektor <i>Ixodes ricinus</i>	74
6.1.1	Fangdaten und Infestationszahlen	74

6.1.2	Bedeutung der „emerging pathogens“ für den Menschen.....	77
6.2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	79
6.2.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> in Zecken von Vögeln	79
6.2.2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> in Zecken von Kleinsäugetern.....	80
6.2.3	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> in wirtssuchenden Zecken	83
6.3	<i>Rickettsia</i> spp.	84
6.3.1	<i>Rickettsia</i> spp. in Zecken von Vögeln.....	84
6.3.2	<i>Rickettsia</i> spp. in Zecken von Kleinsäugetern	85
6.3.3	<i>Rickettsia</i> spp. in wirtssuchenden Zecken.....	86
6.4	<i>Babesia</i> spp.	87
6.4.1	<i>Babesia</i> spp. in Zecken von Vögeln.....	87
6.4.2	<i>Babesia</i> spp. in Zecken von Kleinsäugetern	88
6.4.3	<i>Babesia</i> spp. in wirtssuchenden Zecken.....	90
6.5	Koinfektionen.....	91
6.6	Methodik.....	94
6.7	Schlußfolgerungen und Ausblick	95
Literaturverzeichnis.....		99
Tabellenverzeichnis		121
Abbildungsverzeichnis		123
Danksagung.....		125
Publikationen und Tagungsbeiträge		126
Ehrenwörtliche Erklärung		127

1. Zusammenfassung

Anaplasma phagocytophilum, *Babesia divergens*, *Babesia microti* sowie „spotted fever group“ (SFG) Rickettsien sind Verursacher der humanen granulozytären Anaplasiose (HGA), der Babesiose und Rickettsiose und gewinnen in Europa als sog. „emerging pathogens“ zunehmend an Bedeutung. Seroepidemiologische Studien bei Mensch und Tier belegen zum Teil hohe Prävalenzen dieser Pathogene in Europa. Dies steht in Kontrast zu den vergleichsweise wenigen bisher registrierten humanen Manifestationen oben genannter Erkrankungen in Europa, belegt jedoch das von den Erregern ausgehende Risiko, Infektionen mit einem oder mehreren dieser zeckenassoziierten Pathogene zu erwerben. *Ixodes ricinus* gilt in Mitteleuropa als Hauptvektor dieser Pathogene. Über die speziellen Transmissionszyklen der einzelnen Erreger und vor allem über potentielle Reservoirwirte, die zur Aufrechterhaltung der Pathogene notwendig sind, ist allerdings bisher wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, Informationen über die Rolle von Mäusen und Vögeln als mögliche Reservoir für die oben genannten Pathogene zu erlangen und die Transmissionszyklen innerhalb eines Habitates zu beleuchten.

Zu diesem Zweck wurden von Mai bis Oktober 2007 in 3 Fangperioden insgesamt 658 Zecken der Gattung *I. ricinus* in Reifenstein, Nordthüringen von insgesamt 166 Mäusen, 56 Vögeln und aus dem Freiland gesammelt und mittels PCR, RFLP und Sequenzierung auf das Vorhandensein von *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. untersucht. Außerhalb dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der gleichen Zecken auf *Borrelia* spp. und *F. tularensis* (Franke et al. 2010). Die involvierten Vögel gehörten zur Ordnung Passeriformes und gelten als Zugvögel oder Teilzieher. Die Kleinsäuger gehörten den in Deutschland häufig vorkommenden Gattungen *Apodemus flavicollis* (Gelbhalsmaus) sowie *Myodes glareolus* (Rötelmaus) an.

Insgesamt waren 13,1 % (86/658) der Zecken mit mindestens einem der drei in dieser Arbeit untersuchten Erreger infiziert. Dabei konnte *Anaplasma* spp. in 1,4 % (9/658), Rickettsien spezifische DNA in 2,6 % (17/658) und *Babesia* spp. bei 9,7 % (64/658) der Zecken nachgewiesen werden. Koinfektionen waren in 0,6 % (4/658) zu finden. Die Speziesdifferenzierung ergab die in Deutschland bereits bekannten Spezies *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens*, *Babesia microti*, *Rickettsia helvetica* und *Rickettsia monacensis*.

Anaplasmen wurden mit 3,2 % etwas häufiger in von Vögeln stammenden Zecken als solchen von Kleinsäufern (1,1 %) ermittelt, wobei eine Reservoirfunktion für Anaplasmen bei Vögeln nicht bestätigt werden konnte. Für *Ap. flavicollis* hingegen könnte eine Reservoirfunktion für

Anaplasmen wahrscheinlich sein. Rickettsien wurden am häufigsten in wirtssuchenden Zecken nachgewiesen (4,1 %). In der vorliegenden Arbeit gelang zum ersten Mal der Nachweis von *Rickettsia* spp. auch in von Kleinsäufern stammenden Zecken in Deutschland (1,8 %) und in vogelassozierten Zecken Mitteldeutschlands (2,1 %). Aufgrund der erhobenen Daten konnte für keinen der beiden Wirte eine eindeutige Funktion als Erregerreservoir ermittelt werden. Babesien fanden sich mit einer Prävalenz von 10,7 % in wirtssuchenden, bei 13,2 % der vogelassozierten *I. ricinus* und zu 6,6 % in an Kleinsäufern parasitierenden Zecken. Eine Reservoirfunktion von Vögeln für *B. microti* im untersuchten Habitat erscheint wahrscheinlich. Für *B. divergens* konnte dies nicht eindeutig geklärt werden. Beide untersuchten Kleinsäugerarten scheinen als Reservoir zumindest für *B. microti* dienen zu können. Vögeln kommt für alle drei untersuchten Erregerspezies eine wichtige Rolle als Verbreiter sowohl des Vektors *I. ricinus* als auch der mit diesem assoziierten Pathogene über größere Distanzen zu.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit erstmals Pathogenprävalenzen von wirtssuchenden sowie an zwei verschiedenen Wirtsspezies gesogenen *I. ricinus* innerhalb eines Habitates verglichen. Die Ergebnisse deuten auf *Ap. flavicollis* als möglichen Reservoirwirt für Anaplasmen hin sowie auf Kleinsäuger und Vögel als mögliche Reservoirwirte für *B. microti*. Weitere xenodiagnostische Studien mit sterilen Larven und parasitärischen Wirten sind jedoch nötig, um dies zweifelsfrei zu bestätigen. Aufgrund der ermittelten Prävalenzen im untersuchten Habitat sowie aufgetretenen Koinfektionen bei 4,7 % aller positiv getesteten *I. ricinus*, unter Berücksichtigung der Prävalenz von Borrelien sogar bei 16,7 % (Franke 2010), muss auch von einem im Habitat vorhandenen Risiko für den Menschen ausgegangen werden, sich mit einem der Erreger zu infizieren oder sogar Koinfektionen zu erwerben. Da diese meist mit schwereren Verläufen assoziiert sind und diagnostische und therapeutische Probleme mit sich bringen, stellt die Etablierung neuer Standards in Diagnostik und Therapie zeckenassoziierter Infektionen eine wichtige Voraussetzung dar, um die Ausbreitung der Erreger und mögliche Gefahren für den Menschen zu minimieren.

2. Literaturübersicht

2.1 Vektor *Ixodes ricinus*

2.1.1 Morphologie und Taxonomie

Ixodes ricinus, der gemeine Holzbock gehört innerhalb des Stammes der Arthropoda (Gliederfüßer) zur Klasse der Arachnida (Spinnentiere) und zur Unterklasse der Acari (Milben). In der Überordnung Parasitiformes bildet die Ordnung der Zecken (Ixodida) die drei Familien Ixodidae (Schildzecken, „hard ticks“), Argasidae (Lederzecken, „soft ticks“) und Nuttalliellidae, die nur durch eine einzige Art (*Nuttalliella namaqua*) repräsentiert wird (Rommel et al. 2000). Die Schildzecken, zu denen *I. ricinus* zählt, stellen mit 12 Gattungen und beinahe 700 Arten (Keirans 2009) die größte Familie dar (Barker und Murrell 2008). *Ixodes ricinus* ist die in Mitteleuropa am weitesten verbreitete Zeckenart (Eckert et al. 2008) und gemeinsam mit *I. persulcatus* für über 95% aller in Europa durch Zecken verursachten humanpathogenen Erkrankungen verantwortlich (Süss und Schrader 2004).

Der Körper der *I. ricinus* Zecke besteht aus dem anterior gelegenen Gnathosoma sowie dem posterioren Idiosoma, von dem die sechsgliedrigen Beinpaare abgehen. Das Gnathosoma trägt die paarig angelegten viergliedrigen Pedipalpen (Kiefertaster) und dazwischenliegend ein Paar dreigliedrige Chelizeren (Kieferklauen). In der Mitte sitzt das unpaare Hypostom, das mit Widerhaken versehene Stech- und Klammerorgan der Zecke, an dem Speichelgang und Nahrungsrohr verlaufen (Liebisch 1997, Rommel et al. 2000, Wall und Shearer 2001). Die paarigen Speicheldrüsen sind die größten Drüsen der Zecke und spielen eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation und der Übertragung von Pathogenen (Hillyard 1996). Am Tarsus des ersten Beinpaares befindet sich das nach dem deutschen Naturforscher G. Haller (1881) und nur bei Zecken beschriebene Hallersche Organ, ein grubenförmiger, mit Sinnesborsten ausgestatteter Mechano-, Thermo- und Chemorezeptor, der zur Wirtssuche dient (Liebisch 1997). Der Körper der Zecke wird von einer chitinhaltigen Kutikula umhüllt, die sich während einer Blutmahlzeit durch Neusynthese enorm ausdehnen kann (Sonenshine 1991a). Das Scutum, ein chitinisiertes, nicht dehnbares Schild, das für die Familie der Schildzecken namensprägend war, bedeckt beim Männchen den gesamten Rücken, bei Nymphen und adulten Weibchen ist es nur über der vorderen Rückenhälfte ausgeprägt (Liebisch 1997). Die schwarzbraunen Männchen sind ca. 2,5 mm groß, die ungesogenen kastanienbraunen Weibchen 3-4 mm, gesogen erscheinen diese grau und können bis 11x7 mm lang werden (Liebisch

1997, Rommel et al. 2000). Die Abb. 1 zeigt die verschiedenen Entwicklungsstadien von *I. ricinus*.

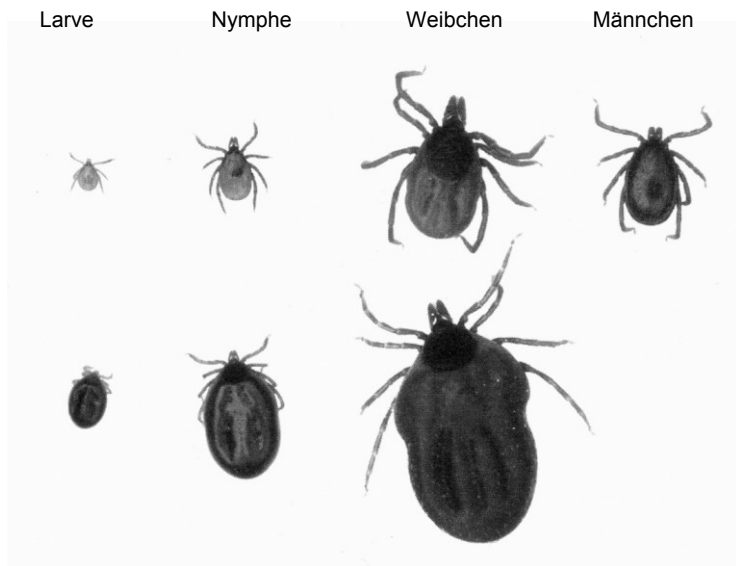


Abb. 1 Die Entwicklungsstadien von *I. ricinus*. In der oberen Reihe sind die Entwicklungsstadien in ungesogenem, in der unteren Bildreihe in gesogenem Zustand abgebildet. Foto G. Olsson (Eisen und Lane 2002).

2.1.2 Wirte und Saugakt

Ixodes ricinus ist eine euryphage Zeckenart, d.h. sie parasitiert auf vielen verschiedenen Wirten. Bisher sind über 300 Wild- und Haustierarten, über 100 Vögel und selbst Reptilien als potentielle Wirte bekannt (Liebisch 1997, Stanek 2009). Wirtssuchende *I. ricinus* finden sich entsprechend der Größe ihres bevorzugten Wirtes in unterschiedlichen Vegetationshöhen. Die ca. 0,5 mm großen Larven halten sich bis zu 10 cm in bodennahen Schichten auf, die der Höhe ihrer Wirtstiere wie Kleinsäuger, Nager oder Vögel entspricht. Die ca. 1 mm großen Nymphen finden sich in 10-50 cm Höhe, wo sie auf Kleinsäuger, Igel, Eichhörnchen, Vögel, Haustierarten, aber auch den Menschen treffen. Adulte Zecken finden sich in ca. 25 cm bis 1 m Höhe und parasitieren an größeren Säugern wie Reh- und Rotwild, Hirsch, Fuchs, Schaf, Rind, Haustieren wie Hunden und dem Menschen (Liebisch 1997, Eckert et al. 2008). Die Zecke erspürt einen geeigneten Wirt mit dem Hallerschen Organ, das Vibrationen, CO₂, Ammoniak, Milchsäure, Pheromone und die Temperatur eines nahenden Wirtes wahrnimmt (Sonenshine 1991b, Hillyard 1996, Liebisch 1997). Geeignete Einstichstellen sind bevorzugt dünnhäutige, gut durchblutete und feuchte Körperareale, z.B. Leistenregion, Achsel oder Haaransatz (Süss und Schrader 2004). Mit Hilfe der Chelizeren wird die Haut des Wirtes aufgeritzt und anschließend das Hypostom im Stichkanal versenkt. Über dieses inokuliert die

Zecke Speichel, der Antikoagulanzen, zytolytische Enzyme, Vasodilatoren wie Prostaglandine, anästhesierende, antiinflammatorische und immunsuppressive Substanzen enthält (Ribeiro 1987, Sonenshine 1991a, Hillyard 1996) und verankert sich über eine ebenfalls sezernierte zementähnliche Substanz in Kutis und Subkutis des Wirtes (Liebisch 1997). Im „feeding pool“ sammeln sich Blut, Lymphe und Gewebsflüssigkeit, die von der Zecke aufgenommen werden. Dabei können evtl. im Wirt befindliche Pathogene auf die Zecke und im nächsten Saugakt an einen nachfolgenden Wirt übertragen werden (Liebisch 1997). Die Nahrungsaufnahme resultiert in einer enormen Zunahme des Körpergewichtes der Zecke, das bei gesogenen Weibchen das 100 bis 200-fache der ursprünglichen Körpermasse erreicht und durch Dehnungs- und Wachstumsvorgänge von Kutikula und Darmepithel ermöglicht wird (Kahl 1994). Während des Saugaktes konzentriert die Zecke die im Vergleich zur Hämolymphe hypotone Blutmahlzeit und reinjiziert überschüssiges Wasser über den Speichel zurück in den Wirt, was zur Maximierung der aufgenommenen Substanzmenge beiträgt (Sonenshine 1991a, Kahl 1994). Auf diese Weise sowie durch Regurgitation von Darminhalt (Liebisch 1997) können pathogene Mikroorganismen aus dem Darm der Zecke den Wirt infizieren (Liebisch 1997, Süss 2007), wobei mit zunehmender Länge des Saugaktes die Gefahr einer Übertragung pathogener Erreger steigt (Kahl et al. 1998, Süss und Schrader 2004). Die Dauer der Nahrungsaufnahme variiert in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium zwischen drei und elf Tagen (Sonenshine 1991a).

2.1.3 Erregerübertragung und Bedeutung als Vektor

Zecken übertragen eine größere Vielfalt an Krankheitserregern auf Mensch und Tier als jede andere Gruppe von Arthropoden (Keirans 2009). *Ixodes ricinus* besitzt Vektorkompetenz für Bakterien wie *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., für Viren wie das FSME-Virus, KKHV-Virus, Louping-III-Virus und für Protozoen wie *Babesia* spp. (Süss und Schrader 2004, Stanek 2009). Damit spielt *I. ricinus* in Europa eine wichtige Rolle als Überträger von sowohl veterinär- als auch humanmedizinisch bedeutsamen Pathogenen (Liebisch 1997).

Die Effektivität als Vektor wird zum einen durch die lange Verweildauer auf dem Wirt begünstigt, die die Aufnahme und Übertragung von Erregern ermöglicht und im Falle von mobilen Wirten auch zur geographischen Verbreitung von Pathogenen beiträgt (Kahl 1994). Zum anderen wird sie durch die geringe Wirtsspezifität verstärkt, die eine Übertragung von Erregern zwischen verschiedenen Wirtstierarten ermöglicht (Hillyard 1996). Vor allem

Nymphen fungieren aufgrund ihres häufigen Vorkommens und der geringen Körpergröße als Krankheitsüberträger beim Menschen. Larven beherbergen oft nur geringe Erregermengen transovariell übertragbarer Pathogene und infizieren den Menschen auch aufgrund ihres noch kleinen Stechorgans seltener (Süss 2007). Da für den Übergang in das jeweils folgende Entwicklungsstadium immer eine Blutmahlzeit benötigt wird, bei der die Gefahr besteht, an einem bakteriämischen, virämischen oder parasitämischen Wirt zu saugen, sind höhere Entwicklungsstadien häufig stärker mit Erregern belastet (Süss und Schrader 2004). Aufgrund der Tatsache, dass die intrazelluläre Verdauung der von der Zecke aufgenommenen Blutmahlzeit sehr langsam erfolgt, verbleiben Blutbestandteile lange unverdaut als Nahrungsreserve im Mitteldarm und stellen somit auch ein Depot für evtl. dort befindliche Pathogene dar. Deren Übertritt durch die Darmwand in das Gewebe (Sonenshine 1991a) und die Speicheldrüsen ermöglichen die Weitergabe der Erreger beim nächsten Saugakt über den Speichel, der ein wichtiges Medium der Erregerverbreitung darstellt. Außer über Speichel und regurgitierten Darminhalt können Wirte auch über befallenen Zeckenkot mit Pathogenen infiziert werden (Raoult und Roux 1997).

Die Übertragung von Mikroorganismen innerhalb einer Zeckenpopulation kann in Abhängigkeit der Erregerspezies transovariell (vertikal) oder transstadial (horizontal) erfolgen. Letzteres bedeutet, dass Erreger innerhalb eines Entwicklungszyklus von einem Zeckenstadium auf das nächste weitergegeben werden (Liebisch 1997) und die Zecke als Vektor fungiert. Die Larven sind dabei in der Regel bis zur ersten Blutmahlzeit nicht infiziert. Transovarielle Transmission findet dagegen statt, wenn Pathogene über die Ovarien des Weibchens auf die nächste Generation übertragen werden und bereits Larven infiziert und so zur Erregerübertragung befähigt sind (Raoult und Roux 1997, Bonnet et al. 2007). In diesem Fall erfüllt die Zecke nicht nur Vektor-, sondern auch Reservoirfunktion für die entsprechenden Pathogene. Reservoirkompetenz beschreibt die Fähigkeit eines Wirtes unter der Voraussetzung einer ausreichenden Erregerkonzentration im Blutkreislauf parasitierende Zecken mit Pathogenen zu infizieren. Als spezieller Übertragungsmechanismus ist zudem für Rickettsien die sexuelle Transmission von einem infizierten Männchen auf ein gesundes Weibchen während der Kopulation beschrieben (Hayes et al. 1980, Raoult und Roux 1997, Eckert et al. 2008). Unabhängig von einer im Wirtstier auftretenden Parasitämie, Virämie oder Bakteriämie können sich Zecken auch über Simultan-Inokulation, sog. “cofeeding“ mit Pathogenen infizieren, indem während eines gleichzeitigen Saugaktes in großer Nähe auf demselben Wirt die Erreger direkt weitergegeben werden.

2.1.4 Entwicklungszyklus und Reproduktion

Schildzecken sind hämatophage Ektoparasiten, die zum Erreichen des nächsten Entwicklungsstadiums, zur Häutung und Eiablage jeweils eine Blutmahlzeit benötigen (Liebisch 1997). Einheimische *I. ricinus* Zecken sind dreiwirtig (Liebisch 1997, Wall und Shearer 2001, Eckert et al. 2008). Der gesamte Entwicklungszyklus, der in Abb. 2 dargestellt ist, beträgt unter klimatisch und wirtsspezifisch günstigen Bedingungen zweieinhalb bis drei, unter ungünstigen bis zu sechs Jahre (Hillyard 1996, Süss und Schrader 2004).

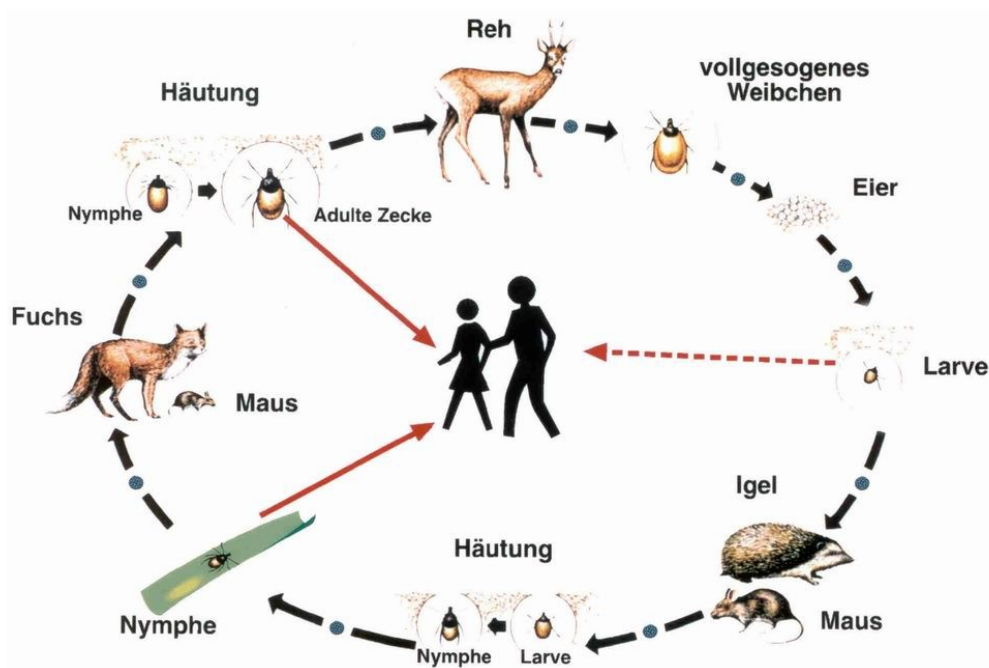


Abb. 2 Der dreiwirtige Entwicklungszyklus von *I. ricinus*. Dargestellt sind die verschiedenen Entwicklungsstadien sowie beispielhaft entsprechende Wirtstiere. Lediglich das adulte Weibchen vollzieht eine dritte Blutmahlzeit vor der Eiablage. (<http://www.geo.de/GEO/mensch/medizin/1387.html?t=img&p=2> [06.07.2010]).

Aus den Eiern schlüpfen nach 20-43 Tagen die sechsbeinigen Larven, die sich nach einer 2-3-tägigen Blutmahlzeit auf einem geeigneten Wirt im Boden innerhalb von fünf bis sieben Wochen zur achtbeinigen Nympe häuten. Die gesogenen Nymphen entwickeln sich nach einer weiteren bis fünf Tage dauernden Blutmahlzeit in 10-18 Wochen zu den ebenfalls achtbeinigen geschlechtsreifen adulten Stadien (Rommel et al. 2000). Lediglich das Weibchen benötigt zur Eiablage einen weiteren sechs bis zehn Tage dauernden Saugakt (Süss und Schrader 2004). Die Kopulation, nach der das Männchen stirbt, erfolgt meist auf dem Wirtstier (Rommel et al. 2000, Süss 2007). Die befruchteten Weibchen fallen vom Wirt ab und

legen artspezifisch nach 8-30 Tagen in feuchter Laubstreu 2000-3000 Eier ab (Rommel et al. 2000, Süss 2007), wonach auch sie sterben. Zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien, der sog. Diapause kann die Zecke unter günstigen Umweltbedingungen auch ein bis zwei Jahre ohne Blutmahlzeit überleben (Süss 2007, Eckert et al. 2008).

2.1.5 Aktivität, Lebensraum und geographische Verbreitung

Das Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* liegt in Europa etwa zwischen dem 40. und dem 60. Breitengrad. In Ost-Westausdehnung erstreckt sich das Vorkommen von der Wolga und dem Kaspischen Meer bis nach Portugal und zum Atlantik, in Nord-Südrichtung von Südsandinavien bis nach Nordafrika in Höhen bis zu 2000 m (Liebisch 1997, Eckert et al. 2008). Je nach klimatischen Verhältnissen kann sich diese Grenze nördlich oder südlich weiter ausdehnen (Gray et al. 2009). Geeignete Habitate für *I. ricinus* stellen Nadel-, Laub- und Mischwälder (Buche, Eiche) mit dichtem Unterholz, Laubstreu und ausgeprägten Kraut- und Strauchschichten dar. Auch in Busch- und Farnkrautlandschaft, Moor, Heide, Wiesen, Parks mit Verbleib des Falllaubes, Gärten und der Nähe zu Gewässern sind sie zu finden (Kahl 1994, Liebisch 1997, Rommel et al. 2000). Zecken benötigen humide Habitate mit einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit von durchschnittlich 80-95 % (Rommel et al. 2000). Das Temperaturoptimum für *I. ricinus* liegt zwischen 17 und 20 °C (Rommel et al. 2000). Erst ab 4,3-4,7 °C Boden- und 6,8-7,1 °C Umgebungstemperatur werden Zecken aktiv, darunter verfallen sie in eine Starre (Sonenshine 1991b, Liebisch 1997).

Die Aktivität unterliegt innerhalb eines Jahres mit einem für Deutschland typischen Temperaturverlauf einem bimodalen Muster mit zwei stadienabhängigen Populationshöhepunkten jeweils im Frühling und Herbst: von Mai-Juni und August-Oktober (Larven), von April-Mai und September-Oktober (Nymphen) und von Mai-Juni und Mitte September-Oktober (Adulte). Es werden jedoch auch unimodale Verläufe beobachtet (Sonenshine 1991b). Die Populationsgipfel finden ihre Entsprechung im saisonalen Befall der Wirtstiere. Der Aktivitätsgrad unterliegt auch circadianen Schwankungen (Kahl 1994, Liebisch 1997). In den letzten Jahren wurden, im Zuge der globalen Erwärmung, zunehmend auch abweichende Aktivitätsverläufe beobachtet (Lindgren et al. 2000, Süss et al. 2008, Gray et al. 2009). Dautel et al. berichteten beispielsweise über eine erstmals in Mitteleuropa nachweisbare durchgängige Winteraktivität von *I. ricinus* Nymphen und Adulten in Brandenburg (Dautel et al. 2008).

Da geeignete Wirtstierarten auch außerhalb des tatsächlichen Verbreitungsgebietes von *I. ricinus* vorkommen, sind es vor allem vegetationsbedingte und klimatische Voraussetzungen wie Temperatur und Luftfeuchte, die Vorkommen, Aktivität und Entwicklungszyklus bestimmen (Liebisch 1997, Randolph 2000). Nur dort, wo Pathogen, Wirt und Vektor gleichzeitig auf geeignete klimatische und vegetative Voraussetzungen treffen, kann eine Pathogentransmission stattfinden (Harrus und Baneth 2005, Reisen 2010). Einerseits sind Habitat, Klima, Mikroklima, geographische und geologische Voraussetzungen, Feuchtigkeit und Vegetationsstruktur Einflussfaktoren auf das Zeckenvorkommen, andererseits ist die entsprechende Abundanz und Interaktion geeigneter Wirte (Mensch, Tier), Reservoir und Vektoren unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung zeckenassoziierter Pathogene (Reisen 2010). Die Dynamiken, denen eine effektive Erregertransmission unterliegt, sind komplex. Sie werden zum einen vom ausreichenden Vorkommen geeigneter Wirte im Habitat bestimmt, die anfällig für eine Infektion und zugleich fähig sein müssen, eine geeignete Infektiösität zu entwickeln, um Erreger weitergeben zu können. Zudem muss ein ausreichender Grad an Kontakt zwischen Wirt und Vektor zustandekommen. Darüberhinaus muss der Vektor *I. ricinus* selbst nach Pathogenaufnahme die Infektion über lange Phasen aufrechterhalten können, um im folgenden Entwicklungsstadium erneut Wirte infizieren zu können (Bjoersdorff et al. 2001, Swanson et al. 2006).

2.1.6 Prophylaxe

Die Expositionsprophylaxe gegenüber Zecken und deren Wirten vor allem in den Monaten Mai bis Oktober gilt als wichtigste Maßnahme, um eine Infektion mit zeckenassozierten Pathogenen zu verhindern. Das Tragen geschlossener, heller Kleidung sowie die Anwendung von Repellentien reduzieren das Infektionsrisiko zusätzlich. Körper und Kleidung sollten nach einer Exposition auf Zecken abgesucht werden. Nach einem Stich sollte die Zecke schonend und unverzüglich mit einer Zeckenzange oder spitzen Pinzette entfernt werden, da mit zunehmender Saugdauer das Infektionsrisiko steigt (Süss et al. 2004, Gray et al. 2010). Auch eine erhöhte Aufmerksamkeit der Bevölkerung und das Bewußtsein für die von Zecken ausgehenden Gefahren in der Öffentlichkeit tragen dazu bei, mit der Zeckenexposition verbundene Risiken zu vermindern (Gray et al. 2010).

2.2 Erreger

2.2.1 *Anaplasma phagocytophilum*

2.2.1.1 Geschichte und Systematik

Anaplasma phagocytophilum gehört zur Gattung *Anaplasma*, die sich gemeinsam mit den Gattungen *Ehrlichia* und *Neorickettsia* in die Familie der Anaplasmataceae und die Bakterienordnung Rickettsiales eingliedert. In der Veterinärmedizin sind bakterielle Erreger der Familie Anaplasmataceae als Tierpathogene seit langem bekannt. Bereits 1935 wurde in Monozyten von Hunden der Erreger der Hundeehrlichiose, *Rickettsia canis*, erkannt (Donatien und Lestoquard 1935). Humanpathogene Erreger aus den Gattungen *Anaplasma*, *Ehrlichia* und *Neorickettsia* wurden erst später entdeckt. Der erste Fall einer durch einen Zeckenbiß übertragenen humanen Ehrlichiose trat 1986 in den USA auf. Als Erreger wurde zunächst *E. canis* vermutet (Maeda et al. 1987), erst 1991 konnte der tatsächliche Erreger als neue Spezies, *E. chaffeensis* definiert werden (Anderson et al. 1991). *Ehrlichia sennetsu* und *E. chaffeensis* befallen Monozyten, weshalb eine resultierende Infektion als HME, humane monozytäre Ehrlichiose bezeichnet wird. Chen beschrieb 1994 die fieberhafte Infektion mehrerer Patienten aus den USA, die Morulae im Zytoplasma von Granulozyten aufwiesen. Er ermittelte einen, den bis dahin nur als tierpathogen bekannten Spezies *E. equi* und *E. phagocytophilum* ähnlichen Erreger, den er HGE-agent (humane granulozytäre Ehrlichiose) nannte (Chen et al. 1994). Seit 2001 fasst man die drei Erreger *E. equi*, *E. phagocytophilum* und HGE-agent als eigene Spezies unter der Bezeichnung *A. phagocytophilum* zusammen und bezeichnet das durch sie hervorgerufene Krankheitsbild als HGA, humane granulozytäre Anaplasmose (Dumler et al. 2001). Den ersten Patienten mit einer HGA in Europa beschrieb Petrovec 1997 in Slowenien (Petrovec et al. 1997). 1998 wurde zudem auch *E. ewingii* als humanpathogen erkannt (Buller et al. 1999). Der Großteil humaner Infektionen wird durch die Spezies *E. chaffeensis*, *E. ewingii* und *A. phagocytophilum* verursacht, wobei auch die weniger gut erforschten Arten *E. canis* und *N. sennetsu* auf den Menschen übertragbar sind (Dumler et al. 2007). Bislang sind ca. 70 HGA Fälle in Europa beschrieben (Doudier et al. 2010).

2.2.1.2 Morphologie, Entwicklungszyklus und Pathogenese

Anaplasmen sind obligat intrazelluläre kokkoide, zum Teil pleomorphe Bakterien mit einer Größe von 0,5-2 µm Durchmesser (Bakken und Dumler 2000). Innerhalb der Wirtszelle befinden sich die Bakterien in membranumschlossenen zytoplasmatischen Vakuolen, wo sie

sich als Elementarkörperchen zu Morulae (Maulbeere) genannten Mikrokolonien zusammenlagern und durch binäre Teilung vermehren (Rikihisa 1991, Dumler et al. 2005). Befallen werden speziesabhängig Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten, aber auch hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Rikihisa 1991). *Anaplasma phagocytophilum* besitzt einen Tropismus für neutrophile Granulozyten und myeloide Zellen. Die Abb. 3 zeigt die Erreger in einem neutrophilen Granulozyten.



Abb. 3 *Anaplasma phagocytophilum* in einem neutrophilen Granulozyten. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme. Foto V. Popov (Dumler et al. 2005).

Über das Oberflächenprotein Msp2 bindet das Bakterium an einen Liganden auf der Granulozytenoberfläche (Herron et al. 2000, Park et al. 2003) und gelangt so über Endozytose in die Wirtszelle. Das die Erreger enthaltende Endosom verhindert die Fusion mit Lysosomen oder Vesikeln des Golgiapparates und umgeht damit die eigene Zerstörung (Webster et al. 1998, Mott et al. 1999). *Anaplasma phagocytophilum* greift auch in den Apoptosemechanismus der Wirtszelle ein, was dem Bakterium in den kurzlebigen Granulozyten die Replikation ermöglicht (Yoshiie et al. 2000, Borjesson et al. 2005). Die Morulae bilden sich ca. 7-12 Tage nach der Infektion (Baumgarten et al. 2000) und haben einen Durchmesser von 1,5-2,5 µm, in Ausnahmefällen bis zu 6 µm (Popov et al. 1998). Die Freisetzung der replizierten Kolonien erfolgt durch Exozytose oder Lyse der Wirtszelle (Rikihisa 1991). Anschließend können die Bakterien neue Wirtszellen infizieren.

2.2.1.3 Vektoren, Wirtstiere und Übertragung

Anaplasma phagocytophilum wird in Europa durch Zecken der Gattung *I. ricinus* übertragen (Parola und Raoult 2001). Seltener fungiert auch *I. trianguliceps* als möglicher Vektor (Bown et al. 2003). Im Osten der USA spielen *I. scapularis*, in den West USA *I. pacificus* und in Teilen Asiens *I. persulcatus* eine wichtige Rolle als Vektoren (Dumler et al. 2005). Das Bakterium wird dabei während einer Blutmahlzeit von der Zecke aufgenommen und

transstadial innerhalb einer Zeckengeneration weitergegeben. Eine transovarielle Übertragung findet bei Anaplasmen nicht statt (Dumler et al. 2001), sodass vor allem den Wirtstieren von *I. ricinus* eine wichtige Rolle als Erregerreservoir zukommt. Einen weiteren Infektionsmechanismus stellt das „cofeeding“ dar (Alekseev et al. 2001). Die Dauer des Saugaktes spielt für die Erregerübertragung eine wichtige Rolle. Katavolos et al. konnten zeigen, dass *A. phagocytophilum* eine Zeitspanne von 36 Stunden für Reaktivierung und Replikation während der Blutmahlzeit der Zecke benötigt, bevor eine Transmission des Erregers stattfindet (Katavolos et al. 1998). Eine Infektion mit *A. phagocytophilum* kann selten außerdem durch perinatale Transmission (Horowitz et al. 1998) oder infizierte Blutprodukte erworben werden (Bakken et al. 1996).

Geeignete Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* sind in den östlichen USA die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*), Kleinsäuger (*Neotoma fuscipes*, *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Myodes* spp.) und der Weißschwanzhirsch (*Odocoileus virginianus*) (Alberdi et al. 2000, Liz et al. 2000, Bakken und Dumler 2000, Dumler et al. 2007). Als Reservoirwirte in Europa fungieren Rehe, Hirsche (de la Fuente et al. 2008, Rosef et al. 2009a), Schafe (Ogden et al. 2003, Ladbury et al. 2008) und Kleinsäuger (Liz et al. 2000). Es wird angenommen, dass die Erreger aufgrund der kurzen Infektionsdauer in Nagetieren im Winter vor allem Zecken als Reservoir nutzen (Bown et al. 2003, Beugnet und Marie 2009). Auch Vögel scheinen bei der Übertragung und Verbreitung der Erreger eine Rolle zu spielen (Alekseev et al. 2001, Bjoersdorff et al. 2001, Skotarczak et al. 2006). Befallen werden können außerdem Hunde (Jensen et al. 2007), Katzen (Bjoersdorff et al. 1999, Magnarelli et al. 2005) und Pferde (Bermann et al. 2002).

2.2.1.4 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie

Klinik

Das klinische Bild der HGA ist variabel und reicht von asymptomatischen Verläufen, die in etwa zwei Dritteln der Fälle auftreten, über relativ milde selbstlimitierende bis hin zu schweren Verläufen mit zum Teil tödlichem Ausgang, wobei schwere Krankheitsverläufe häufig assoziiert sind mit höherem Lebensalter, Immunsuppression, Vorerkrankungen des Patienten und verzögertem Therapiebeginn (Baumgarten et al. 2000). Zirka die Hälfte der Patienten wird hospitalisiert und bis zu 17 % der Patienten müssen intensivmedizinisch betreut werden (Bakken und Dumler 2006). Die Todesrate wird auf <1 % geschätzt (Bakken und Dumler 2006). Sieben bis 21 Tage nach einem Zeckenstich (Rikihisa 1991, Bakken und Dumler 2000) manifestiert sich die HGA als unspezifische hochfieberhafte Erkrankung

(93 %) mit Mylagien (77 %) und Kopfschmerzen (76 %). Etwas seltener treten Arthralgien (46 %) und Beteiligung des Gastrointestinaltraktes auf mit Übelkeit (38 %), Erbrechen (26 %) und Durchfall (16 %). Auch ein Befall des ZNS mit Nackensteife (21 %) und Verwirrung (17 %) kann vorkommen (Dumler et al. 2007).

Typische laborchemische Veränderungen sind Leukozytopenie mit Linksverschiebung (49 %), Thrombozytopenie (71 %) und erhöhte Serumaminotransferasen ASAT und ALAT (71 %) (Dumler et al. 2007), CRP - und BSG-Erhöhung, Anstieg der alkalischen Phosphatase und der Laktatdehydrogenase (Baumgarten et al. 2000). Mögliche Komplikationen sind u.a. septischer Schock oder Toxic Schock Syndrom (TSS)-ähnliche Symptome, Koagulopathie, atypische Pneumonie oder ARDS, akutes Abdomen, Rhabdomyolyse, Myokarditis, akutes Nierenversagen, neurologische Komplikationen wie demyelinisierende Polyneuropathie und opportunistische virale und Pilzinfektionen (Dumler et al. 2005). Obgleich bei Tieren beschrieben, gibt es keine Evidenz für eine Persistenz von *A. phagocytophilum* im Menschen (Dumler et al. 2005).

Diagnostik

Zum direkten Erregernachweis ist die PCR-Analyse aus EDTA-Blut die Methode der Wahl zur frühen Diagnosesicherung (Dumler et al. 2007). Die für die HGA typischen Morulae werden im mikroskopischen Direktnachweis mittels Giemsa gefärbtem Blutaussstrich oder der Leukozytenfraktion des Blutes („buffy coat“) nachgewiesen. Die Methode dient der schnellen Diagnosesicherung, ist allerdings nicht sehr sensitiv, da sich lediglich bei 20-80 % der Patienten Morulae in infizierten neutrophilen Granulozyten finden (Bakken und Dumler 2006). Die Anzucht des Erregers in Zellkultur ist ebenfalls möglich, allerdings Speziallaboren vorbehalten (Dumler et al. 2007). Der indirekte Erregernachweis erfolgt durch die Serologie mittels IFT (Immunfluoreszenztest) oder Western-Blot zum Nachweis von Antikörpern. Sie eignet sich nicht zur Akutdiagnostik, da messbare Titeranstiege erst ein bis vier Wochen nach Krankheitsbeginn nachweisbar sind, sondern wird vor allem in späteren Krankheitsstadien eingesetzt oder für retrospektive Untersuchungen, da Antikörper meist über mehrere Jahre nachweisbar bleiben (Baumgarten et al. 2000). Die spezifische Diagnose wird nach den Kriterien der „Consensus Approach for Ehrlichiosis (CAFÉ) Society“ gestellt (Walker 2000).

Therapie

Empirische Daten belegen, dass alle Formen der Ehrlichiose auf eine Behandlung mit Tetracyklinen ansprechen. Die aktuelle Therapieempfehlung zur Behandlung der HGA besteht in der Gabe von Doxycyclin bei Erwachsenen und niedriger dosiert auch bei schwer erkrankten

Kindern. Cephalosporine, β -Lactam-Antibiotika, Makrolide und Aminoglykoside sind wirkungslos gegenüber *A. phagocytophilum*. Bei Kindern unter acht Jahren wird eine dreitägige Doxycyclingabe empfohlen, gefolgt von der Behandlung mit einem anderen Antibiotikum (z.B. Amoxicillin) bis zum 14. Tag. Als Alternative steht bei Doxycyclinallergie, Schwangerschaft und nicht ernsthaft erkrankten Kindern unter acht Jahren Rifampicin zur Verfügung (Bakken und Dumler 2006, Dumler et al. 2007).

2.2.2 *Rickettsia* spp.

2.2.2.1 Geschichte und Systematik

Die Gattung *Rickettsia* gehört zur Familie der Rickettsiaceae innerhalb der Ordnung Rickettsiales, die wiederum der Klasse der α -Proteobakterien angehört. Sie wurde nach Howard T. Ricketts benannt, der 1906 *R. rickettsii* als Erreger des „Rocky Mountain spotted fever“ (RMSF) identifizierte und die Rolle von Zecken in deren Transmissionszyklus beschrieb (Ricketts 1906). Man unterscheidet drei Gruppen humanpathogener Rickettsien: die Fleckfiebergruppe („spotted fever group“, SFG), die Typhusfiebergruppe („typhus group“, TG) und Rickettsien der Tsutsugamushifiebergruppe („scrub typhus group“, STG) (Roux und Raoult 2000). Zur TG-Gruppe gehören *R. prowazekii* und *R. typhi*, Erreger des Typhus exanthematicus, des klassischen Fleckfiebers sowie des murinen Fleckfiebers (endemischer Typhus). Hier fungieren Ratten und andere Nagetiere als Erregerreservoir (Blanco und Oteo 2006). Zur Tsutsugamushigruppe gehört nur die Spezies *Orientia tsutsugamushi*, die von Milbenlarven übertragen wird. Die größte Gruppe stellt mit über 20 verschiedenen Arten die der SFG-Rickettsien dar (Raoult und Roux 1997, Borretti et al. 2009, Dobler und Wölfel 2009). Zu ihr gehören unter anderem die humanpathogenen Spezies *R. rickettsii*, *R. conorii*, Erreger des „mediterranean spotted fever“ (MSF), auch als Boutonneuse-Fieber bekannt (Blanco und Oteo 2006), *R. akari*, das die Rickettsienpocken verursacht sowie *R. sibirica* („Siberian tick typhus“), *R. australis* („Queensland tick typhus“), *R. rhipicephali* und *R. montanensis*; außerdem die zwischen 1984 und 2005 als sog. „emerging pathogens“ (EP) identifizierten Erreger *R. japonica* (Japanisches Fleckfieber), *R. africae* („African tick bite fever“), *R. honei* („Flinders island spotted fever“), *R. slovaca* (TIBOLA), *R. heilongjiangensis*, *R. aeschlimannii*, *R. parkeri*, *R. helvetica*, *R. massiliae*, *R. marmionii*, *R. felis*, *R. monacensis* und *R. raoultii* (früher *R. sp. RpA4*), deren humanpathogenes Potential bislang ungeklärt ist (Roux und Raoult 2000, Parola et al. 2005b, Blanco und Oteo 2006, Dobler und Wölfel 2009). Die erste klinische Beschreibung des RMSF geht auf Maxey 1899 (Ricketts 1909)

zurück. Der früheste Fall eines MSF wurde 1910 in Tunis von Conor beschrieben, der Erreger *R. conorii* nach ihm benannt (Conor und Bruch 1910). Über viele Jahrzehnte galt *R. conorii* als einziger Erreger von SFG-Rickettsiosen in Europa und Afrika. Während des 20. Jahrhunderts wurden weltweit viele Rickettsienarten in Zecken entdeckt, doch häufig als nicht pathogen eingestuft. So wurde zum Beispiel *R. helvetica* bereits 1979 aus *I. ricinus* Zecken in der Schweiz isoliert (Burgdorfer et al. 1979), doch erst später die Pathogenität erkannt (Parola et al. 2005b). In Deutschland kommen gegenwärtig mindestens sechs Rickettsienarten in Zecken vor (*R. helvetica*, *R. felis*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. raoultii*), von denen fünf Krankheiten beim Menschen auslösen können. Das Pathogenitätspotential von *R. raoultii* ist bislang ungeklärt (Dobler und Wölfel 2009).

2.2.2.2 Morphologie, Entwicklungszyklus und Pathogenese

Rickettsien sind 0,3-1 µm große gramnegative obligat intrazelluläre Bakterien von kokkoider, stäbchenförmiger oder pleomorpher Gestalt. Sie vermehren sich im Menschen durch Zweiteilung in Endothelzellen kleiner bis mittlerer Blutgefäße, in die sie durch Phagozytose gelangen (Parola et al. 2005a). Viele der Pathogenitätsfaktoren von Rickettsien sind noch ungeklärt. Nach der Internalisation lysiert das Phagosom und die Rickettsien befinden sich frei im Zytoplasma (Parola et al. 2005b). SFG-Rickettsien findet man darüber hinaus auch im Zellkern der Wirtszelle (Raoult und Roux 1997). Nach der Aufnahme der Rickettsien in die Endothelzellen des Menschen kommt es zur Vaskulitis (Raoult und Roux 1997) mit Minderperfusion, Anoxie und erhöhter Gefäßpermeabilität, außerdem Hyperplasie, Nekrosen und Thrombosierung (Walker et al. 2003). Das Austreten von Erythrozyten verursacht das klassische Exanthem. Nach der Lyse der Wirtszelle gelangen die Erreger erneut in den Blutkreislauf.

2.2.2.3 Vektoren, Wirtstiere und Übertragung

Als Vektoren für die Übertragung von Rickettsien fungieren Arthropoden wie Zecken, Läuse, Milben und Flöhe (Dobler und Wölfel 2009). Sie übertragen die Erreger über Speichel oder Fäzes auf Vertebraten (Raoult und Roux 1997). *Rickettsia akari* und *O. tsutsugamushi* werden von Milben übertragen, die TG-Rickettsien von Läusen (*R. prowazekii*) und Flöhen (*R. typhi*) (Raoult und Roux 1997). Zecken sind die Hauptvektoren und Reservoir von SFG-Rickettsien. Dabei haben sich verschiedene Spezies an unterschiedliche Zeckenarten als Vektoren angepasst (Raoult und Roux 1997, Parola et al. 2005b). In Europa ist *I. ricinus* die häufigste Zeckenart und neben *Dermacentor reticulatus* (RKI 2007) und *D. marginatus* ein Vektor und

Reservoir für SFG-Rickettsien (Parola et al. 2005b), hauptsächlich für *R. helvetica* und *R. monacensis* (RKI 2009, Dobler und Wölfel 2009). Auf den Menschen können Rickettsien durch Stiche infizierter Arthropoden, kontaminierte Aerosole (Oster et al. 1977) oder Bluttransfusion übergehen (Wells et al. 1978). Die Übertragung von Rickettsien auf Zecken kann sowohl transovariell als auch transstadial erfolgen. Transovarielle Übertragung wurde für eine Vielzahl von SFG-Rickettsien wie *R. slovaca* (Rehacek 1984), *R. africae* (Kelly und Mason 1991), *R. parkeri* (Goddard 2003), *R. helvetica* (Burgdorfer et al. 1979), *R. sibirica* (Rudakov et al. 1999) und *R. rickettsii* (Schriefer und Azad 1994) nachgewiesen. Auch sexuelle Erregertransmission von infizierten Männchen auf nicht infizierte Weibchen wird bei *I. ricinus* und *D. andersoni* beschrieben (Philip und Parker 1933, Hayes et al. 1980), darüberhinaus stellt „cofeeding“ einen möglichen Infektionsmechanismus dar (Raoult und Roux 1997).

Die Rolle von Vertebraten als Reservoir für Rickettsien ist nicht vollständig geklärt. In früheren Studien wurden Kleinsäuger wie bestimmte Mäuse-, Eichhörnchen- oder Streifenhörnchenarten als potentielle Reservoir angenommen (Burgdorfer et al. 1966). Mehrere Studien konnten zeigen, dass Zugvögel als Wirte für Zecken fungieren und diese die damit assoziierten Erreger über große Distanzen verteilen, auch wenn sie selbst kein Reservoir für Rickettsien darstellen. Vögeln kommt so eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Verbreitung von einigen Zeckenarten und den mit ihnen assoziierten Erregern zu (Santos-Silva et al. 2006, Ioannou et al. 2009, Elfving et al. 2010).

2.2.2.4 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie

Klinik

Rickettsien verursachen je nach der infizierenden Spezies verschiedene Krankheitsbilder beim Menschen. Die Hauptsymptome von SFG-Rickettsiosen bestehen nach einer Inkubationszeit von 6-10 Tagen im plötzlichen Auftreten von hohem Fieber ($\geq 39^\circ\text{C}$), Kopfschmerz, Myalgie, Lymphadenopathie, Ausschlag und kutanen Läsionen (Raoult und Roux 1997, Parola et al. 2005a) und werden je nach Krankheitserreger von weiteren Symptomen ergänzt. Laborchemisch finden sich häufig eine leichte Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie. Auch Hyponatriämie, Hypoalbuminämie sowie Veränderungen der Leber- und Nierenwerte können auftreten. Die Krankheit kann mild bis tödlich verlaufen und dauert ca. zwei bis drei Wochen (Raoult und Roux 1997).

Die einzige bekannte Rickettsiose mit dem Potential zu chronifizieren und noch nach Jahren als milder verlaufender Morbus Brill-Zinsser reaktiviert zu werden, ist das durch *R.*

prowazekii verursachte Läuse-Fleckfieber, der epidemische Typhus (Dobler und Wölfel 2009).

Diagnostik

Als schnelles, sensitives und spezifisches Nachweisverfahren hat sich der Direktnachweis des Erregers mittels PCR und anschließender Sequenzierung aus Blut oder Gewebeproben etabliert. Die Anzucht von Rickettsien in Zellkultur, Hühnerembryonen oder durch Inokulation in Tiere ist ebenfalls möglich, bleibt allerdings Speziallaboren vorbehalten (Parola et al. 2005a, Dobler und Wölfel 2009). Lange galt der unspezifische, auf Kreuzreaktion von Antikörpern gegen Proteus-Antigenen beruhende Weil-Felix-Test als Diagnoseverfahren (Dobler und Wölfel 2009). Heute werden als serologische Methoden zum indirekten Erregernachweis Antikörper gegen Rickettsien mittels Mikroimmunfluoreszenzassay (MIF), ELISA und Western Blot bestimmt. Diese können ab dem 7.-15. Tag nach Krankheitsbeginn nachgewiesen werden, wobei ein vierfacher Titeranstieg als Infektionsbeweis dient (Raoult und Roux 1997, Brouqui et al. 2007). Zwischen verschiedenen SFG-Rickettsienspezies besteht Kreuzreaktivität, sodass allein serologisch zwischen den Spezies nicht differenziert werden kann (Brouqui et al. 2007).

Therapie

Mittel der Wahl ist Doxycyclin per os, in schweren Fällen sollte die Gabe i.v. erfolgen. Alternativ kann Ciprofloxacin eingesetzt werden (Brouqui et al. 2007, Dobler und Wölfel 2009). Minocyclin stellt eine Therapieoption für Kinder dar (Cascio et al. 2004) ebenso wie die Makrolide Azithromycin und Clarithromycin, die auch in der Schwangerschaft eingesetzt werden können. Auch Josamycin hat sich als wirksam erwiesen und kann bei Erwachsenen sowie geringer dosiert bei Kindern verabreicht werden (Cascio et al. 2002, Dobler und Wölfel 2009). Penicilline, Aminoglycoside und Cephalosporine sind unwirksam gegenüber Rickettsien, der Einsatz von Kortikosteroiden in schweren Fällen ist umstritten (Parola et al. 2005b).

2.2.3 *Babesia* spp.

2.2.3.1 Geschichte und Systematik

Die Gattung *Babesia* gehört zur Familie Babesiidae innerhalb der Ordnung der Piroplasmida und der Klasse der Sporozoa (Homer et al. 2000). Benannt ist sie nach dem rumänischen Biologen Victor Babes, der sie 1888 als Erreger einer fieberhaften Hämoglobinurie bei Rindern entdeckte (Babes 1888). 1893 identifizierten Smith und Kilbourne *B. bigemina* als Erreger des Texasfiebers, der erste Nachweis, dass Arthropoden als Vektoren für Pathogene

fungieren (Smith und Kilbourne 1893). In der Veterinärmedizin sind Babesien schon lange als Erreger der Hundemalaria oder Weiderot beim Rind bekannt (Rommel et al. 2000). Insgesamt sind über 100 Babesienarten beschrieben (Hunfeld et al. 2008). Besonders hervorzuheben sind als humanpathogene Spezies *B. microti*, vor allem in Nordamerika vorkommend und *B. divergens*, hauptsächlich Infektionen bei immunsupprimierten oder splenektomierten Patienten in Europa verursachend (Hunfeld et al. 2002), wobei sich die Verbreitungsgebiete beider Erreger zunehmend mischen (Hunfeld et al. 2008). Auch sind mittlerweile *B. divergens* Fälle bei immunkompetenten Patienten aufgetreten (Haapasalo et al. 2010, Martinot et al. 2011). Daneben gewinnen neue, bisher noch nicht vollständig charakterisierte Spezies, als humanpathogene Erreger von Babesiosen an Bedeutung (Herwaldt et al. 2004, Conrad et al. 2006, Hunfeld et al. 2008). So wurden in Europa bisher drei Fälle humaner Babesiose durch *B. venatorum* (EU1) beobachtet (Herwaldt et al. 2003, Häselbarth et al. 2007). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass einige der in der Literatur als Infektionen mit *B. divergens* beschriebenen Infektionen tatsächlich durch *B. venatorum* (EU1) ausgelöst wurden. Aktuell werden humanpathogene *Babesia* spp. wie folgt klassifiziert (Gray et al. 2010):

- *B. microti*
- *B. duncani*
- *B. divergens*, *B. divergens*-like, *B. venatorum* (EU 1)
- KO1 (South Korea), *B. bovis*, *B. canis*

Der erste Fall einer humanen Babesiose, verursacht durch *B. divergens*, wurde 1956 in Jugoslawien beschrieben (Skrabalo und Deanovic 1957). Die erste Infektion eines Menschen mit *B. microti* in den USA ereignete sich 1969 (Western et al. 1970). *Babesia microti* wurde bereits 1912 von Franca in Feldmäusen nachgewiesen (Franca 1912), *B. divergens* ist seit 1911 durch M'Fadyean und Stockman bekannt (M'Fadyean und Stockman 1911).

Als humanpathogen gelten bislang sieben Spezies: *B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani* (früher WA-1, CA-5), *B. venatorum* (früher EU1) sowie eine neue, zunächst als KO1 bezeichnete Art (Hunfeld et al. 2008). Gegenwärtig sind ca. 47 Fälle (43 x *B. divergens*, 3 x *Babesia* sp. EU1, 1 x *B. microti*) humaner Babesiose in Europa dokumentiert (Hildebrandt et al. 2008, Hunfeld et al. 2008, Gray et al. 2010, Haapasalo et al. 2010, Martinot et al. 2011). Einzelfälle von Infektionen mit *B. microti* wurden auch aus Taiwan, Japan und Europa berichtet (Shih et al. 1997, Saito-Ito et al. 2000, Hildebrandt et al. 2007).

2.2.3.2 Morphologie, Entwicklungszyklus und Pathogenese

Babesien sind intraerythrozytär parasitierende pleomorphe Protozoen und werden morphologisch in zwei Gruppen, die großen Babesien (Trophozoiten 2,5-5 μm) und die kleinen Babesien (Trophozoiten 1-2,5 μm), die phylogenetisch eng verwandt mit Theilerien sind und zu denen *B. gibsoni*, *B. microti* und *B. rodhaini* zählen, eingeteilt. Diese Klassifizierung stimmt mit der phylogenetischen Abstammung überein, mit Ausnahme von *B. divergens*, die morphologisch zu den kleinen (Trophozoiten 0,4-1,5 μm), genetisch jedoch neben *B. bovis*, *B. caballi* und *B. canis* zu den großen Babesien gehören (Hunfeld et al. 2008). Der Entwicklungs- und Reproduktionszyklus von Babesien gliedert sich in zwei Phasen, die Abb. 4 veranschaulicht.

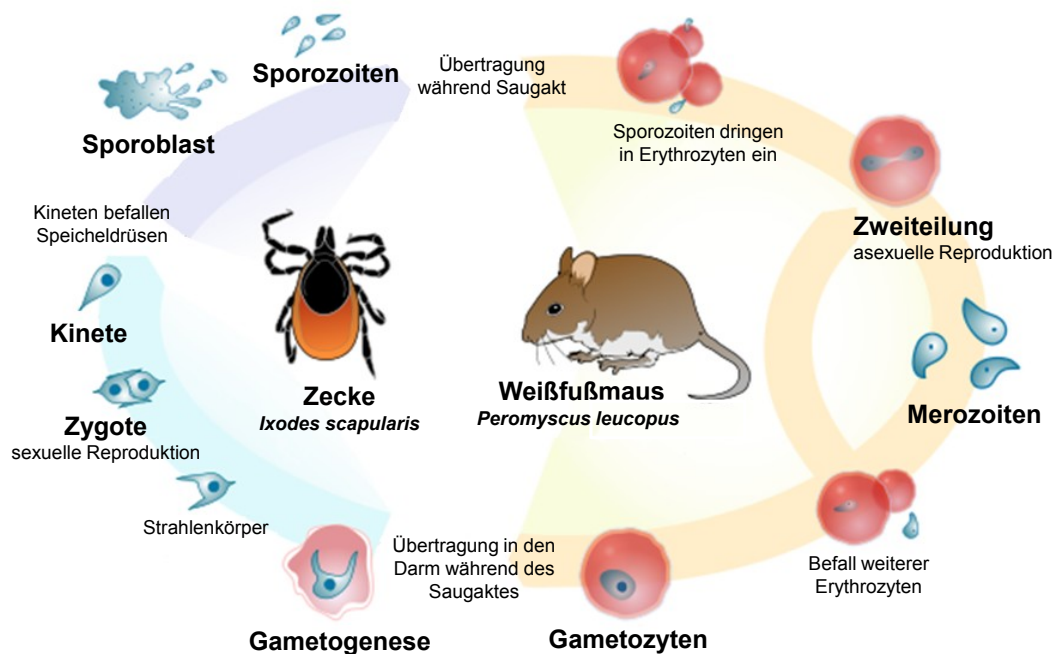


Abb. 4 Der Entwicklungszyklus von *Babesia* spp. Die Reproduktion gliedert sich in einen asexuellen Abschnitt, die Merogonie innerhalb der Erythrozyten des Wirbeltierwirtes (rechts) und einen sexuellen Vermehrungsschritt, die Gamogonie als Sporozoiten innerhalb der Zecke (links) (Abb. bearbeitet nach: [http://www.clker.com/cliparts/4/0/9/8/12641388931661880834 Babesia_micro-ti_life_cycle_en.svg](http://www.clker.com/cliparts/4/0/9/8/12641388931661880834/Babesia_micro-ti_life_cycle_en.svg) [03.09.2010]).

Die Infektion wird während des Saugaktes der Zecke durch Inokulation von Sporozoiten übertragen, die sich in den Erythrozyten des Wirtes zu Trophozoiten entwickeln und durch Zweiteilung zu Merozoiten werden. Durch Lyse der Wirtszelle können diese neue Erythrozyten befallen. Einige Trophozoiten entwickeln sich zu Gametozyten. Saugt eine Zecke an einem infizierten Wirt, nimmt sie die Gametozyten auf, die innerhalb der Zecke zu Strahlenkörpern werden, zur Zygote fusionieren, um sich danach zu Kineten zu entwickeln. Die Kineten gelangen über die Hämolymphe der Zecke in alle Organe und bei transovariell

übertragbaren Erregern auch in die Ovarien. In den Speicheldrüsen entstehen durch Zyklen asexueller Reproduktion, der Sporogonie, aus den Kineten über Sporoblasten neue Sporozoiten, die dann bei der nächsten Blutmahlzeit wieder in den Wirt inokuliert werden können (Zintl et al. 2003, Hunfeld et al. 2008). Zum Eindringen in den Erythrozyten kommt es durch die Sekretion lytischer Produkte der Rhoptrien an der Apikalseite der Babesien, die zur Invagination der Erythrozytenmembran führen (Zintl et al. 2003). Der Erregerbefall bewirkt die Lyse des Wirtserythrozyten und so über Hämolyse eine Anämie, wobei auch die exzessive Produktion proinflammatorischer Zytokine eine Rolle zu spielen scheint (Gray et al. 2010). Über die genauen Pathogenitätsmechanismen von Babesien ist relativ wenig bekannt (Hunfeld et al. 2008).

2.2.3.3 Vektoren, Wirtstiere und Übertragung

Als Vektoren für Babesien dienen ausschließlich Zecken der Gattung *Ixodes* (Homer et al. 2000). Eine Ausnahme stellt *B. meri* dar, das von *Ornithodoros erraticus* übertragen wird (Gunders 1977). Als Vektor für *B. divergens* in Europa fungiert *I. ricinus*, während in den USA *I. scapularis* Hauptvektor ist (Hunfeld et al. 2008). In Japan tritt *I. ovatus* als Vektor für *B. microti* auf (Saito-Ito et al. 2004). Die Vektoren und Reservoir für *B. duncani* sind bisher unbekannt (Hunfeld et al. 2008).

Als Reservoirwirte für *B. microti* gelten Kleinsäuger der Gattung *Microtus*, Carnivore und Insektivore (Hunfeld et al. 2008), außerdem Primaten und der Mensch (Homer 2000). In den USA ist die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) wichtigster Reservoirwirt. Das Wirtsspektrum von *B. divergens* umfasst Rinder, einige Nagerarten und ebenfalls den Menschen (Homer et al. 2000). *Babesia venatorum* (EU1) nutzt außerdem Rotwild als Reservoir (Bonnet et al. 2007). Obgleich einige Babesienarten Vögel als Wirte nutzen (Peirce 2005), ist deren Reservoirkompetenz noch nicht sicher geklärt (Skotarczak et al. 2006). Auf den Menschen übertragen werden Babesien durch den Stich infizierter Zecken (Uilenberg 2006), wobei die Länge des Saugaktes die Effektivität der Erregertransmission erhöht (Homer et al. 2000). Auch durch Bluttransfusion und selten transplazentar kann eine Übertragung stattfinden (Kjemtrup und Conrad 2000). Innerhalb einer Zeckenpopulation ist eine transovariable Erregertransmission nur für große Babesien wie *B. divergens* beschrieben, nicht jedoch für *B. microti* (Walter und Weber 1981, Homer et al. 2000, Gray et al. 2002, Gray et al. 2010).

2.2.3.4 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie

Klinik

Infektionen mit *B. divergens* verlaufen in der Regel schwerer als solche mit *B. microti* (RKI 2006). Sie gehen nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Wochen mit Hämoglobinurie und Ikterus, persistierend hohem Fieber (40-41 °C), Schüttelfrost, Kopfschmerzen und Myalgie einher, Erbrechen und Durchfall können zusätzlich auftreten (Vannier und Krause 2009). Respiratorisches, kardiales, Nieren- und Leberversagen drohen neben Ekchymosen, Petechien und Koma als Komplikationen. Die Krankheit verläuft zumeist fulminant, wobei die Mortalitätsrate bei 40 % liegt (Zintl et al. 2003). Die drei bisher beschriebenen Fälle von *B. venatorum* (EU1) traten bei splenektomierten Patienten mit Hodgkin Lymphom auf (Vannier und Krause 2009). Sie verursachten ähnliche, aber mildere Symptome.

Babesia microti Infektionen treten nach einer Inkubationszeit von ein bis neun Wochen auf (Vannier und Krause 2009), verlaufen oft asymptomatisch oder mild mit zunächst grippeähnlichen Symptomen. Bei älteren, splenektomierten, immunsupprimierten oder Patienten mit Krebsleiden können jedoch auch schwere Verläufe vorkommen mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie respiratorischem und kardialen Versagen, DIC, Koma oder terminaler Niereninsuffizienz. Die Mortalitätsrate liegt bei 5 % (Vannier und Krause 2009). Persistierende Parasitämien über Monate oder Jahre können unter Umständen vorkommen (Krause et al. 1998, Homer et al. 2000). Laborchemisch lässt sich aufgrund der hämolytischen Anämie eine erhöhte Retikulozytenzahl feststellen, in der Hälfte der Fälle außerdem eine Erhöhung der Leberenzyme (ASAT, ALAT) (Vannier und Krause 2009).

Diagnostik

Der Direktnachweis des Erregers erfolgt schnell und sensitiv mittels PCR und anschließender Sequenzierung. Außerdem dient die Mikroskopie eines Giemsa gefärbten Blutausstrichs zur Detektion von intraerythrozytären Parasiten. Die morphologischen Erscheinungsformen innerhalb der Erythrozyten sind unterschiedlich und reichen von einzelnen Ringen über einzeln oder gepaart liegende birnenförmige Trophozoiten bis zu den als Malteserkreuze beschriebenen tetraeden Formen (Homer et al. 2000). Die Abb. 5 zeigt ein mögliches mikroskopisches Erscheinungsbild von Babesien.

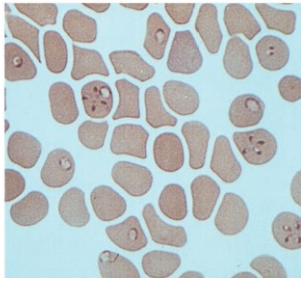


Abb. 5 Giemsa gefärbter Blutausstrich eines Hamsters. In den Erythrozyten sind die kreuzförmig angeordneten Babesien (WA1) sichtbar (Homer et al. 2000).

Schwierigkeiten bestehen im Erkennen der Erreger bei nur geringer Parasitämie sowie der Differenzierung gegenüber einer Infektion mit *Plasmodium falciparum*, bei der allerdings zumeist das Pigment Hämozoin nachweisbar ist (Gray et al. 2010). Als indirekter Erregernachweis wird die Serologie mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von Antikörpern eingesetzt (Homer et al. 2000, Hunfeld et al. 2008). Bei untherapierten Patienten kann eine asymptomatische Infektion mit *B. microti* über Monate bis Jahre bestehen (Krause et al. 1998). Für *B. divergens* wurde bisher kein chronischer Verlauf beschrieben (Gray et al. 2010).

Therapie

Zur Therapie der Babesiose wird in schweren Fällen eine Kombination aus Clindamycin und Quinin per os empfohlen. Alternativ kann Atovaquone in Kombination mit Azithromycin verabreicht werden, was mit weniger Nebenwirkungen behaftet ist und die Therapie der Wahl bei mildereren Krankheitsverläufen darstellt (Krause et al. 2000, Hunfeld et al. 2008, Gray et al. 2010). Immunsupprimierte oder schwer erkrankte Patienten können durch die Gabe von Austauschtransfusion oder Plasmapherese profitieren (Machtinger et al. 1993, Evenson et al. 1998, Gray et al. 2010).

2.2.4 Koinfektionen

Ixodes ricinus als Vektor zeckenassoziierter Pathogene ist in der Lage Koinfektionen im Wirt und somit auch beim Menschen hervorzurufen (Swanson et al. 2006). Dies geschieht entweder durch mehrere Stiche einzelner infizierter Zecken oder den Stich einer bereits mehrere Erreger tragenden Zecke (Belongia 2002). Eine Infektion mit mehreren Pathogenen birgt mitunter erhebliche diagnostische und therapeutische Schwierigkeiten und kann Dauer und Schwere der auftretenden Symptome verstärken (Krause et al. 2002, Swanson et al. 2006). In zahlreichen Studien wurden Koinfektionen in *I. ricinus* detektiert (Hildebrandt et al. 2003, Skotarczak et al. 2003, Stańczak et al. 2004, Wójcik-Fatla et al. 2009, Pauliks 2009, Reis et

al. 2011, Reye et al. 2010, Hildebrandt et al. 2010b). In einigen konnten sogar Tripleinfektionen in einzelnen Zecken nachgewiesen werden (Skotarczak et al. 2003, Pauliks 2009, Reis et al. 2011, Reye et al. 2010). Evidenz für Mehrfachinfektionen beim Menschen ergaben v.a. seroepidemiologische Studien (Pusterla et al. 1998, Hunfeld und Brade 1999, Hermanowska-Szpakowicz et al. 2004), wobei nur schwer zwischen tatsächlichen Koinfektionen und lediglich nacheinander auftretenden Infektionen mit zwei verschiedenen Erregern differenziert werden kann (Belongia 2002).

3. Zielsetzung

Anaplasma phagocytophilum, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. verursachen als sog. „emerging pathogens“ die humane granulozytäre Anaplasmosen (HGA), humane Rickettsiosen und Babesiosen, die zu den „emerging infectious diseases“ (EID – neu auftretende Infektionskrankheiten) zählen (Kjemtrup und Conrad 2000, Dumler et al. 2007, Dobler und Wölfel 2009). Ihre Bedeutung nahm in den letzten Jahren innerhalb Europas stetig zu, was auf klimatische Veränderungen, das Auftreten neuer Stämme, aber auch Verbesserungen auf diagnostischem Gebiet zurückzuführen ist. Obgleich in der Veterinärmedizin seit langem bekannt, ist das Wissen über die Transmissionszyklen der Pathogene zwischen ihren Vektoren und möglichen Reservoirwirten noch unzureichend. Insbesondere welche Tierarten als Reservoir für welche Spezies fungieren, ist nicht hinreichend geklärt. In epidemiologischen Studien erhobene Daten bezüglich der Seroprävalenz von Antikörpern gegen diese Pathogene wurden zum Teil hohe Durchseuchungsraten bei Tieren, aber auch Menschen innerhalb Europas und Deutschlands ermittelt. Dies steht in nur unzureichendem Bezug zu den bisher relativ selten beschriebenen Fällen humaner Manifestationen oben genannter Erkrankungen in Europa, die durch sehr unterschiedliche, zum Teil auch tödliche Verläufe gekennzeichnet sind.

Als Auslöser der humanen granulozytären Anaplasmosen gelten fünf Spezies der Gattungen *Ehrlichia* spp. und *Anaplasma* spp. (Dumler et al. 2007). Bisher wurden ca. 70 HGA Fälle in Europa beschrieben (Doudier et al. 2010), allerdings keiner davon in Deutschland. Die Zahl der bisher in Europa aufgetretenen Rickettsiosen ist nur schwer zu beziffern. In Deutschland kommen mindestens sechs *Rickettsia* Spezies vor, von denen fünf als humanpathogen gelten (Dobler und Wölfel 2009). Die humane Babesiose ist bisher in ca. 47 Fällen innerhalb Europas dokumentiert (Hunfeld et al. 2008, Haaspasalo et al. 2010, Martinot et al. 2011). In Deutschland wurde gegenwärtig erst über zwei Erkrankungen an humaner Babesiose berichtet. Auslöser waren das *Babesia divergens*-like Pathogen *Babesia* sp. EU1 und *B. microti*, zum ersten und bislang einzigen Mal europaweit als ursächlich für eine Erkrankung im Menschen nachgewiesen (Häselbarth et al. 2007, Hildebrandt et al. 2007). Insgesamt können sieben verschiedene *Babesia* Spezies Erkrankungen beim Menschen hervorrufen (Hunfeld et al. 2008).

Das Wissen um die Prävalenzen dieser Pathogene, die Identifizierung möglicher Reservoirwirte und das Verständnis über deren geographisches Vorkommen, Bewegungspfade und saisonale Migration ist erforderlich, um die Verbreitung zeckenassoziierter Pathogene

sowie das von ihnen ausgehende Risiko für den Menschen in unterschiedlichen Regionen zu beurteilen (Daniels et al. 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, potentielle Reservoirwirte auf ihre Infestation mit *I. ricinus* zu untersuchen und die in diesen vorkommenden Genospezies von *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. mithilfe molekularbiologischer Methoden zu analysieren.

Es sollte die Frage geklärt werden, inwieweit bestimmte einheimische Vogelarten als Wirte und mögliche Reservoir für *I. ricinus* fungieren und zur Verbreitung von zeckenassoziierten Pathogenen beitragen; außerdem, welche Rolle in Deutschland häufig vorkommenden Kleinsäugerarten als Wirte und potentielle Reservoir von zeckenübertragenen Erregern zukommt. Darüberhinaus sollten Aussagen über das Erregerspektrum und die Erregerprävalenzen von im selben Habitat gesammelten wirtssuchenden *I. ricinus* getroffen werden, um deren Rolle als Vektor zu bestätigen. Es sollte zum einen ermittelt werden, wie hoch die Prävalenzen von *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. in den Zecken unterschiedlichen Ursprungs sind, zum anderen welche Subspezies auftreten und wie diese mit den verschiedenen Wirten in Verbindung stehen. Außerdem galt es, mögliche Koinfektionen zu erfassen. Zusätzlich erweiterte sich das untersuchte Erregerspektrum der gesammelten Zecken außerhalb dieser Arbeit noch auf Borrelien und *Francisella tularensis*. Die entsprechenden Untersuchungen erfolgten im Institut für Ernährungswissenschaften und im Friedrich-Löffler-Institut in Jena (Franke 2010, Franke et al. 2010).

Anhand der Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf die Rolle von Kleinsäugetieren und Vögeln als mögliche Reservoirwirte für die oben genannten zeckennassoziierten Pathogene gezogen werden. Die Detektion der Erreger in wirtssuchenden und parasitierenden Zecken sowie der Nachweis von Koinfektionen können auch der Einschätzung eines von diesen Erregern ausgehenden Risikos humaner Infektionen im untersuchten Habitat dienen.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

Die in der Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1 Geräte und Verbrauchsmaterial.

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank		Memmert, Schwabach
Elektrophoresekammer	DNA Sub Cell™	BioRad, München
Elektrophoresekammer	Multigel-Long	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Wide Mini Sub™Cell	BioRad, München
Geldokumentationssystem	Image Master®VDS	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kühlakku	Isopack, Isorack	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Samsung Classic Collection	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach
Pipette	Reference®	Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/CA (USA)
Spannungsquelle	Power Pac 200	BioRad, München
Spektrometer	Nano Drop®ND-1000	PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heraeus Instruments GmbH, Gera
Sterile Werkbank	Template Tamer™	QBiogene, Heidelberg
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T 3000	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Mastercycler®ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch		PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vakuumpzentrifuge	DNA Speed vac DNA110	Thermo Savant, Bonn
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Vortexer	Wizard X Vortex Mixer	Velp Scientifica, Usmate (Italien)
Zentrifuge	Roth®Microcentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zentrifuge	Centrifuge 5415 A	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

4.2 Reagenzien, Chemikalien, Pufferlösungen, Enzyme

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Reagenzien, Chemikalien und Enzyme sind in Tab. 2 veranschaulicht. Die Herstellung von TAE-Puffer und des Ladepuffers Orange G zeigen Tab. 3 und Tab. 4.

Tab. 2 Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Enzyme.

Name	Hersteller
Agarose Gel Extraction Kit	Jena Bioscience GmbH, Jena
Agarose	PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>AluI</i> 10 units/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot
AmpliSize™Molecular Ruler 50-2000 bp Ladder	BioRad, München
Aqua dest. (Ultra-Pure Water System)	Millipore, Schwalbach
DEPC behandeltes Wasser für Molekularbiologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	GE Healthcare, München
Eisessig 100 % Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GenElute™Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Orange G	Sigma Aldrich, Hamburg
<i>SspI</i> 10 units/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR Green	Biozym Oldendorf
TaKaRa Ex Taq™ 5 units/ μ l	Takara Bio, Otsu (Japan)
TaKaRa Ex Taq Buffer	Takara Bio, Otsu (Japan)
TaKaRa dNTP Mix je 2,5 mM	Takara Bio, Otsu (Japan)
Trisbase	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tab. 3 Herstellung des TAE-Puffers.

1xTAE hergestellt aus 50xTAE: 20 ml 50xTAE add 1 l

50xTAE-Puffer	
242 g	Tris-Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

Tab. 4 Herstellung des Ladepuffers Orange G.

Orange G	
0,1 g	0,5 % Orange G
10 ml	Aqua dest.
10 µl	Glycerin
25 mM	EDTA (1 ml 0,5 M EDTA) oder 186 mg/20 ml

4.3 Untersuchungsgebiet

Als Untersuchungsgebiet diente die Region Reifenstein, die zur Gemeinde Kleinbartloff gehört und im Eichsfeld in Nordthüringen liegt. Insgesamt wurden 658 Zecken der Gattung *I. ricinus* von freilebenden Kleinsäugetern, Vögeln und aus dem Freiland gesammelt. Dies geschah in zwei unterschiedlich großen Arealen innerhalb des Untersuchungsgebietes. Das Hauptfanggebiet mit einer Größe von ca. 15 ha Fläche (a) besteht aus einem Buchenwald, einem Auenwaldrest in Form einer Feuchtwiese und Ackerflächen mit zwei mit Schilfbewachsenen Klärteichen und wird von einem Wassergraben durchzogen. Die zweite Fangfläche ist ca. 8 ha groß (b), umfasst den sog. „Schafsteich“ mit Schilf- und Sauergrasbewuchs, einer gut entwickelten Kraut- und Strauchschicht sowie einigen Laubbäumen (Franke 2010). Die Fanggebiete sind in Abb. 6 und Abb. 7 veranschaulicht.



Abb. 6 Fanggebiete Reifenstein, Gemeinde Kleinbartloff/ Thüringen. (Foto: Google Earth).



Abb. 7 Fangfläche Klärteich (a) und Schafsteich (b) in Reifenstein. (<http://www.riparia.de/KT.jpg>, <http://www.hotel-reifenstein.de> [23.06.2010]).

4.4 Das Sammeln der Zecken

Das Sammeln der Zecken erfolgte im Zeitraum von Mai bis Oktober 2007 durch die Arbeitsgruppe um Prof. W. Dorn, Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena. Es wurden Zecken von lebenden Kleinsäugetern und Vögeln gesammelt sowie wirtssuchende Zecken aus dem Freiland. Um sicherzustellen, dass eine Erregerübertragung vom Wirtstier auf den Parasiten tatsächlich möglich war, wurden nur gesogene Zecken zur Untersuchung herangezogen. Zur Gewinnung der von Kleinsäugetern stammenden Zecken wurden in drei Fangperioden von Juni bis August 2007 ca. 100 Lebendfallen im Untersuchungsgebiet aufgestellt und täglich kontrolliert. Nach der Narkotisierung gefangener Tiere mit Diethylether und deren Artbestimmung wurden die gesogenen Zecken abgesammelt und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gekühlt ins Labor transportiert. Die zur Untersuchung herangezogenen Vögel wurden von Dr. Andreas Goedecke, einem Ornithologen, im Zeitraum von Mai bis August 2007 mit Stellnetzen zur routinemäßigen Beringung gefangen. Während dieser Arbeit wurden gesogene *I. ricinus* mit einer spitzen Pinzette entnommen und anschließend gekühlt ins Labor gesandt. Zum Sammeln von im Freiland befindlichen Zecken wurde die Methode des „Flagging“ angewandt. Dabei wurden weiße Baumwolltücher über niedrige Vegetationsschichten gestreift und daran haftende Nymphen und adulte Zecken abgesammelt. Ungesogene Larven wurden aufgrund der geringen Größe und der dadurch zu erwartenden geringen DNA-Menge nicht eingeschlossen. Fangdatum, Wirtstier, Geschlecht sowie Entwicklungsstadium wurden bei jeder Zecke protokolliert und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C im Kälteschrank asserviert. Die Zuordnung der untersuchten *I. ricinus* zu den Jahreszeiten erfolgte gemäß den drei Fangperioden nach folgender Einteilung: Frühling 01.05.-19.06.2007, Sommer 09.07.-16.08.2007 und Herbst 26.08.-14.10.2007.

4.5 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus den Zecken erfolgte mit dem GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) und wurde am Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena nahezu vollständig durch die Arbeitsgruppe von Prof. W. Dorn durchgeführt. Nach dem Auftauen und der Separation der Proben erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Zecken mit einem Pistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nach Zugabe von 180 µl Lysis Solution T sowie anschließend 20 µl Proteinase K folgte eine zweistündige Inkubation bei 55 °C. Zur Zelllyse erfolgte die Zugabe von 200 µl Lysis Solution C und die Proben wurden 15 Sekunden gevortext und erneut bei 55 °C für zwei Stunden inkubiert. Danach wurden zur Erhöhung des Bindeverhaltens der DNA je 500 µl Column Preparation Solution in jede in einem 2 ml Sammeltube sitzende Miniprep Bindsäule des Kits gegeben und diese anschließend für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Danach wurden zum Ausfällen der DNA 200 µl 95-100 % Ethanol zum Lysat gegeben und die Proben für 5-10 Sekunden gevortext. Der Inhalt des Tubes wurde dann auf die Bindsäule gegeben und für eine Minute bei 8500 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß platziert. Es folgten zwei Waschschriffe unter Zugabe von 500 µl Wasch Solution 1 und einminütiger Zentrifugation bei 8500 U/min. Nach erneutem Verwerfen des Durchlaufs und dem Platzieren der Säule in ein neues Sammeltube, wurden 500 µl Wash Solution zugegeben und drei Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Um Ethanolreste zu entfernen erfolgte nochmals eine Zentrifugation für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß platziert. Zur Elution der an die Säule gebundenen DNA wurden zweimal 50 µl Elution Solution auf die Säule gegeben, die Proben fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach eine Minute bei 8500 U/min zentrifugiert. Die Aufbewahrung der Aliquote erfolgte bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung.

4.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die UV-Absorptionsspektrometrie wird zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren eingesetzt. Nach dem Lambert-Beersche-Gesetz ist die gemessene Extinktion direkt proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz c und der zu durchlaufenden Schichtdicke d (Jahnson 2007).

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

ε = Molarer Extinktionskoeffizient [$l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$]

d = Länge der Messstrecke (Küvette) [cm]

c = Konzentration der absorbierenden Moleküle [$mol \times l^{-1}$]

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde je 1 μl jeder DNA-Probe unverdünnt im Nano Drop®ND-1000 Spektrometer analysiert.

Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 5 $\mu g/ml$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu g/ml$ einzelsträngiger DNA oder RNA und 33 $\mu g/ml$ Oligonukleotiden. Dies gilt für Nukleinsäuren bei pH 7,0. Durch die teilweise Überlagerung der Absorptionsspektren von Nukleinsäuren und Proteinen, deren Absorptionsmaximum aufgrund aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm liegt, lassen sich auch Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäure-Präparation ziehen. Das Verhältnis der Absorptionswerte, der optischen Dichte OD_{260}/OD_{280} sollte bei einer reinen DNA-Probe bei 1,8, bei einer reinen RNA-Lösung bei 2 liegen. Signifikant geringere Werte weisen auf Verunreinigungen etwa durch Phenol oder Proteine hin (Sambrook und Russell 2001).

4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.7.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, mit dessen Hilfe ein definierter DNA-Abschnitt unter zyklisch ablaufenden Reaktionsbedingungen mittels einer hitzebeständigen Taq-Polymerase und unter Einsatz zweier flankierender Primer beliebig amplifiziert werden kann (Mullis und Faloona 1987). Dabei dient ein einzelsträngiger DNA-Strang als Matrize, an den durch komplementäre Basenpaarung zugefügte Oligonukleotide hybridisieren. Eine DNA-Polymerase synthetisiert in 3'-5'-Richtung den komplementären Strang, der wiederum als Template im nächsten Zyklus fungiert, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung des vorliegenden DNA-Abschnitts erzielt wird. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei aufeinanderfolgenden temperaturabhängigen Reaktionsschritten, die in einem Thermocycler ablaufen. Zunächst erfolgt bei 90-94 °C die Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts in Einzelstränge. Im folgenden Schritt, Annealing genannt, erfolgt die sequenzspezifische

Bindung der Primer an die komplementären Basen der DNA. Dazu muss die Reaktionstemperatur primerabhängig erniedrigt werden. Anschließend geschieht entsprechend des Aktivitätsoptimums des verwendeten Enzyms, die Extension, die Synthese des Komplementärstranges. Als Polymerase findet häufig die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum bei 72 °C Verwendung. Die Zugabe der Desoxynukleotidtriphosphate, dATP, dCTP, dGTP, dTTP sollte äquimolar erfolgen und die Pufferbedingungen sind an die jeweils verwendete Polymerase anzupassen. Die Länge des als Template fungierenden DNA-Abschnittes ist von der Aktivität der Polymerase abhängig und sollte optimalerweise zwischen 0,1–1 kb Paaren liegen (Lottspeich 2006).

4.7.2 Erregerspezifische PCR

Zur Amplifikation der jeweiligen Zielgene von *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. wurde unter einer sterilen Werkbank und unter Verwendung erregerabhängiger Primer ein Mastermix pipettiert, dessen Zusammensetzung Tab. 5 zu entnehmen ist. Um Kontamination zu vermeiden, erfolgte die Zugabe der DNA-Probe in einem separaten Raum. Zur Qualitätskontrolle wurden pro Ansatz je eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten folgende DNA-Proben: *B. divergens* und *B. microti*, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Ute Mackenstedt, Universität Hohenheim sowie *A. phagocytophilum* und *R. monacensis* von Frau Prof. Ulrike Munderloh, University of Minnesota. Als Negativkontrolle wurden statt der DNA-Probe 5 µl DEPC-Wasser in den Ansatz pipettiert. Die erregerabhängig modifizierten PCR-Bedingungen im Thermocycler sind Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 5 Pipettierschema für den PCR-Ansatz.

Reagens	Volumen
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
Puffer	5 µl
Primer 1 (0,2~1,0 µM)	0,5 µl
Primer 2 (0,2~1,0 µM)	0,5 µl
DEPC-Wasser	34,75 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,25 µl
DNA (1-50 ng/µl)	5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tab. 6 Erregerabhängige PCR-Bedingungen im Thermocycler. (*phag.-phagocytophilum*, spp.-species pluralis).

	<i>Anaplasma phag.</i>		<i>Rickettsia spp.</i>		<i>Babesia spp.</i>	
	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	94 °C	5 min	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec	94 °C	20 sec
Annealing	56 °C	30 sec	54 °C	30 sec	55 °C	20 sec
Elongation	72 °C	1,3 min	72 °C	1,3 min	72 °C	30 sec
Finale Elongation	72 °C	7 min	72 °C	7 min	72 °C	7 min

4.7.2.1 PCR *Anaplasma phagocytophilum*

Zum Nachweis von *A. phagocytophilum* wurde ein Abschnitt des 16S rRNA Gens mittels PCR amplifiziert (Hildebrandt et al. 2002). Als Primer wurden Ap16S1f (forward) und Ap16S1r (reverse) eingesetzt, deren Sequenzen in Tab. 7 dargestellt sind. Die PCR ergab im positiven Fall ein Fragment von 944 bp Länge. Abb. 8 zeigt den amplifizierte Bereich des 16S rRNA Gens von *A. phagocytophilum*.

Tab. 7 Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR zum Nachweis von *A. phagocytophilum*. (A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin).

Primer	Sequenz
Ap16S1f (forward)	5' - CAA GCT TAA CAC ATG CAA GTC GAA C - 3'
Ap16S1r (reverse)	5' - CCC TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT C - 3'

1	CAAGCTTAAC	ACATGCAAGT	CGAACGGATT	ATTCTTTATA	GCTTGCTATA	AAGAATAGTT
	Ap16S1f (forward)					
61	AGTGGCAGAC	GGGTGAGTAA	TGCATAGGAA	TCTACCTAGT	AGTATGGGAT	AGCCACTAGA
121	AATGGTGGGT	AATACTGCAT	AATCCCTGCG	GGGGAAGAT	TTATCGCTAT	TAGATGAGCC
181	TATGTTAGAT	TAGCTAGTTG	GTAGGGTAAA	GGCCTACCAA	GGCGATGATC	TATAGCTGGT
241	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC	ACTGGAAGT	AGATACGGTC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG
301	CAGTGGGGA	TATTGACCAA	TGGGCGCAAG	CCTGATCCAG	CTATGCCGCG	TGAGTGAGGA
	Schnittstelle SspI					
361	AGGCCTTAGG	GTTGTAAAAC	TCTTTCAGTA	GGGAAGATAA	TGACGGTACC	TACAGAAGAA
421	GTCCCGGCAA	ACTCCGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGGA	GGGGGCAAGC	GTTGTTCCGA
481	ATTATTGGGC	GTAAGGGCA	TGTAGGCGGT	TCGGTAAGTT	AAAGGTGAAA	TGCCAGGGCT
541	TAACCTGGA	GCTGCTTTTA	ATACTGCCAG	ACTAGAGTCC	GGGAGAGGAT	AGCGGAATTC
601	CTAGTGTAGA	GGTGAAATTC	GTAGATATTA	GGAGGAACAC	CAGTGGCGAA	GGCGGCTATC
661	TGGTCCGGTA	CTGACGCTGA	GGTGCAGAA	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCCCTG
721	GTAGTCCACG	CTGTAAACGA	TGAGTGCTGA	ATGTGGGGAT	TTTTTATCTC	TGTGTTGTAG
781	CTAACGCGTT	AAGCACTCCG	CCTGGGGACT	ACGGTCGCAA	GACTAAAACT	CAAAGGAATT
841	GACGGGGACC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT
901	TACCACTCCT	TGACATGGAG	ATTAGATCCT	TCTTAACGGA	AGGGCGCAGT	TCGGCTGGAT
	Ap16S1r (reverse)					
961	CTCGCACAGG	TGCTGCATGG	CTGTCGTCAG	CTCGTGTCGT	GAGATGTTGG	GTTAAGGTCC
1021	CGCAACGAGC	GTAACCCCTCG	TCCTTA			

Abb. 8 Partialsequenz des 16S rRNA Gens von *A. phagocytophilum*. Dargestellt ist ein Auszug des 16S rRNA Gens von *A. phagocytophilum* mit der Access. No: AJ313513 der NCBI-Datenbank. Farblich markiert sind die Primersequenzen (grün) sowie die Schnittstelle des Restriktionsenzym *SspI* (rot). (A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin, die Zahlen am linken Rand entsprechen der jeweiligen Basenpaarposition).

4.7.2.2 PCR *Rickettsia* spp.

Zur Detektion einer Infektion mit *Rickettsia* spp. wurde ein Teil des Zitratsynthasegens *glta* unter Verwendung der Primer RH 314 (forward) und RH 654 (reverse), deren Sequenzen in Tab. 8 dargestellt sind, amplifiziert. Die PCR wurde nach Nilsson et al. (Nilsson et al. 1999) durchgeführt und ergab ein 340 bp langes Fragment. Abb. 9 stellt den amplifizierten Teil aus der Sequenz des Zitratsynthasegens *glta* dar.

Tab. 8 Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR zum Nachweis von *Rickettsia* spp. (A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin).

Primer	Sequenz
RH 314 (forward)	5' - AAA CAG GTT GCT CAT CAT TC - 3'
RH 654 (reverse)	5'- AGA GCA TTT TTT ATT ATT GG - 3'

1	TGATTTTTTA	GAAGTGGCAT	ATTTACTGAT	TTATGGGGAA	CTACCAAGTA	GTGAGCAGTA
61	TAATAATTTT	ACTAAACAGG	TTGCTCATCA	TTTCATTAGT	AATGAAAGAT	TACACTATTT
	RH 314 (forward)					
121	ATTTCAAACC	TTTTGTAGCT	CTTCTCATCC	TATGGCTATT	ATGCTTGCGG	CTGTTGGTTC
181	TCTTTCGGTA	TTTTATCCTG	ATTTATTGAA	TTGTAAGGAA	GCAGACTACA	AACTTACTGC
241	TATTAGAATG	ATTGCTAAGA	TACCTACCAT	CGCCGCAATG	TCTTATAAAT	ATTCTATAGG
	Schnittstelle SspI					
301	ACAACCGTTT	ATTTATCCTG	ATAATTCGTT	AGATTTTACC	GAAAATTTTC	TGCATATGAT
361	GTTTGCAACG	CCTTGTCAGG	AATATAAAGT	AAATCCAATA	ATAAAAAATG	CTCTTAATAA
	RH 654 (reward)					
421	GATATTTATC	CTACATGCCG	ATCATGAGCA	GAATGCTTCT	ACTTCAACAG	TCCGAATTGC
481	CGGCTCATCT	GGAGCTAACC	CTTTTGCTTG	TATTAGTACG	GGTATTGCAT	CACTTTGGGG
541	ACCTGCTCAC	GGTGGGGCTA	ATGAAGCGGT	AATAAATATG	CTTAAAGAAA	TTGGTAGTTC
601	TGAGAATATC	CCTAAATATA	TAGCTAAAGC	TAAGGATAAA	AATGATCCGT	TTAGGTAAAT
661	AGGCTTCGGT	CATCGTGTAT	ATAAAAACTA	CGATCCACGT	GCCGCAGTAC	TAAAGAAAC
721	TTGTAAGGAA	GTATTAAAGG	AACTCGGACA	GCTAGAAAAC	AATCCGCTCT	TACAAATAGC
781	AATAGAACTT	GAAGCTATCG	CTCTTAAAGA	TGAATATTTT	ATTGAGAGAA	AATTATATCC
841	AAATGTTGAT	TTTTATTTCG	GTATTATCTA	TAAAGCTATG	GGTA	

Abb. 9 Partialsequenz des Zitratsynthasegens *gltA* von *R. helvetica*. Dargestellt ist ein Auszug der Sequenz des Zitratsynthasegens *gltA* von *R. helvetica* mit der Access. No. DQ131912 der NCBI-Datenbank. Farblich markiert sind die Primersequenzen (grün) sowie die Schnittstelle des Restriktionsenzym *SspI* (rot). (A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin, die Zahlen am linken Rand entsprechen der jeweiligen Basenpaarposition).

4.7.2.3 PCR *Babesia* spp.

Babesia spp. wurde durch Amplifikation des 18S rRNA Gens mit Hilfe der Primer Bab (forward) und Bab 16S rev (reverse) unter Entstehung eines 284 bp langen Fragmentes nachgewiesen wie 2004 durch Hartelt et al. beschrieben (Hartelt et al. 2004). Die Primersequenzen sind in Tab. 9 veranschaulicht. Den amplifizierten Teil der Sequenz des 18S rRNA Gens zeigt Abb. 10.

Tab. 9 Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR zum Nachweis von *Babesia* spp. (A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin, R-Purinbase [Adenin, Guanin]).

Primer	Sequenz
Bab 18S fw (forward)	5'- TAG RGA TTG GAG GTC GTC A - 3'
Bab 18S rev (reverse)	5'- AAC GGA ATT AAC CAG ACA AA - 3'

1	AACCTGGTTG	ATCCTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTCTTAA	AGATTAAGCC	ATGCATGTCT
61	TAGTATAAGC	TTTTATACAG	CGAAACTGCG	AATGGCTCAT	TAAAACAGTT	ATAGTTTATT
121	TGATGTTTCG	TTTACATGGA	TAACCGTGGT	AATTCTAGGG	CTAATACATG	CTCGAGGCGC
181	GTTTTCGCGT	GGCGTTTATT	AGACTTTAAC	CAACCCTTCG	GGTAATCGGT	GATTCATAAT
241	AAATTAGCGA	ATCGCATGGC	TTTGCCGGCG	ATGTATCATT	CAAGTTTCTG	ACCTATCAGC
301	TTTGGACGGT	AGGGTATTGG	CCTACCGGGG	CGACGACGGG	TGACGGGGAA	TTGGGGTTTC
361	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA
421	ATTACCCAAT	CCTGACACAG	GGAGGTAGTG	ACAAGAAATA	ACAATACAGG	GCTTAAAGTC
481	TTGTAATTGG	AATGATGGGA	ATCTAAACCC	TTCCCAGAGT	ATCAATTGGA	GGGCAAGTCT
541	GGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT	ATTAAAGTTG	TTGCAGTTAA
601	GAAGCTCGTA	GTTGAATTTT	TGCCTTGTCA	TTAATCTCGC	TTCCGAGCGT	TTTTTTATTG
661	ACTTGGCATC	TTCTGGATTT	GGTGCCTTCG	GGTACTATTT	TCCAGGATTT	ACTTTGAGAA
721	AACTAGAGTG	TTTCAAACAG	GCATTCGCCT	TGAATACTAC	AGCATGGAAT	AATGAAGTAG
781	GACTTTGGTT	CTATTTTGTT	GGTTATTGAG	CCAGAGTAAT	GGTTAATAGG	AGCAGTTGGG
841	GGCATTTCGT	TTTAACTGTC	AGAGGTGAAA	TTCTTAGATT	TGTTAAAGAC	GAAGTACTGC
901	GAAAGCATTT	GCCAAGGATG	TTTTTCATTAA	TCAAGAACGA	AAGTTAGGGG	ATCGAAGACG
961	ATCAGATACC	GTCGTAGTCC	TAACCATAAA	CTATGCCGAC	TAGAGATTGG	AGGTCGTCAG
					Bab 18S fw (forward)	
1021	TTTAAACGAC	TCCTTCAGCA	CCTTGAGAGA	AATCAAAGTC	TTTGGGTTCT	GGGGGGAGTA
1081	TGGTCGCAAG	TCTGAAACTT	AAAGGAATTG	ACGGAAGGGC	ACCACCAGGC	GTGGAGCCTG
1141	CGGCTTAATT	TGACTCAACA	CGGGAAACCT	CACCAGGTCC	AGACATAGAG	AGGATTGACA
1201	GATTGAT AGC	TCTTCTTGA	TTCTATGGGT	GGTGGTGCAT	GGCCGTCTTT	AGTTGGTGGA
	Schnittstelle AluI					
1261	GTGAT TTTGTGTC	TGGTTAATTG	CGTTAACGAA	CGAGACCTTA	ACCTGCTAAA	TTAGGATCTG
	Bab 18S rev (reverse)					
1321	GGACAAGCTT	TGCTGTTCCA	GTATCGCTTC	TTAGAGGGAC	TTTGC GTTCA	TAAAACGCAA
1381	GGAAGTGTA	GGCAATAACA	GGTCTGTGAT	GCCCTTAGAT	GTCCTGGGCT	GCACGCGCGC
1441	TACACTGATG	CATTCAACGA	GTTTTTCCTT	GGCCGTCGGG	TCCGGGTAAT	CTTACAGTAT
1501	GCATCGTGAT	GGGGATAGAT	TATTGCAATT	ATTAATCTTG	AACGAGGAAT	GCCTAGTAGG
1561	CGCGAGTCAT	CAGCTCGTGC	CGACTACGTC	CCTGCCCTTT	GTACACACCG	CCCGTCGCTC
1621	CTACCGATCG	AGTGATCCGG	TGAATTATTC	GGACCAAGAA	ACGTGGATTG	GTCCTTCGTT
1681	TTTTGGAAAG	TTTTGTGAAC	CTTATCACTT	AAAGGAAGGA	GAAGTCGTAA	CAAGGTTTCC
1741	GTAGGTGAAC	CTGCGGAAGG	ATCATTC			

Abb. 10 Partialsequenz des 18S rRNA Gens von *B. microti*. Die Abbildung zeigt einen Auszug der Sequenz des 18S rRNA Gens von *B. microti* mit der Access. No: AY693840 der NCBI-Datenbank. Farblich markiert sind die Primersequenzen (grün) sowie die Schnittstelle des Restriktionsenzym *AluI* (rot). (A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin, die Zahlen am linken Rand entsprechen der jeweiligen Basenpaarposition).

4.8 Agarose Gelelektrophorese

4.8.1 Prinzip

Die Elektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung von Biomolekülen, das auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld beruht und diese entsprechend ihrer Größe und Ladung separiert. Als Trägermaterial wird zur Trennung von Nukleinsäuren häufig Agarose verwendet, ein Polysaccharid aus D- und L-Galaktose (Sambrook und Russell 2001). Agarose löst sich durch Aufkochen und geliert beim Abkühlen unter Bildung einer stabilen Gitterstruktur. In Abhängigkeit der Agarosekonzentration bei der Herstellung des Gels lassen sich DNA-Fragmente über einen sehr variablen Größenbereich separieren. Dabei verwendet man höher konzentrierte Gele (kleine Poren) zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente und niedrigkonzentrierte Gele (großen Poren) für längere Moleküle. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandern im elektrischen Feld

zur Anode. Dabei ist die Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts (Jahnson 2007). Für die Analyse der in dieser Arbeit untersuchten PCR-Produkte wurde ein 2 %iges Agarosegel (2 g Agarose/100 ml TAE Puffer) gegossen, dem zur Visualisierung der DNA-Fragmente der Farbstoff Sybr®-Green I (Biozym Diagnostic GmbH) (5 µl/100 ml) zugegeben wurde. Dieser bindet an die DNA, absorbiert blaues ($\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$), was zur Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Licht genutzt wird. Jeder Probe wurde der Probenauftragspuffer Orange G zugefügt. Unter Mitführung eines kommerziellen, an den aufzutrennenden Größenbereich angepassten DNA-Markers als Längenstandard erfolgte in Abhängigkeit der Größe der Elektrophoresekammer die Auftrennung der Moleküle zwischen 90-100 V über jeweils 60-85 Minuten. Die entstandenen Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Bei Auftreten einer solchen im erwarteten Bereich wurde die Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in einem 1,5 ml Tube bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

4.9 Restriktion

4.9.1 Prinzip

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die Nukleinsäuren präzise an einer bestimmten Nukleotidsequenz schneiden. Genetisch nicht identische Organismen unterscheiden sich in der Anzahl und Position dieser Restriktionsorte, wodurch DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Dies bezeichnet man als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Restriktionsenzyme erkennen palindromisch angeordnete Sequenzen von 4-8 bp Länge und hydrolysieren an diesen Stellen die Phosphorsäurediesterbindungen der DNA sequenzspezifisch. Somit entstehen DNA-Fragmente von definierter Länge, die zur Identifikation der PCR-Produkte verwendet werden können. Definitionsgemäß ist eine Einheit des Enzyms die Menge, die 1 µg DNA in 1 Stunde spaltet (Lottspeich 2006).

4.9.2 Erregerspezifische Restriktion

Zur Identifikation und Verifizierung der in der PCR entstandenen Ergebnisse erfolgte von allen in der Gelelektrophorese als positiv gewerteten Banden ein Restriktionsverdau. Das Pipettierschema für den jeweiligen Restriktionsansatz ist in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10 Erregerspezifisches Pipettierschema für den Restriktionsansatz. (*phag.-phagocytophilum*, spp.-species pluralis).

	<i>Anaplasma phag.</i>	<i>Rickettsia spp.</i>	<i>Babesia spp.</i>
Restriktionsenzym	<i>Ssp I</i>	<i>Ssp I</i>	<i>Alu I</i>
DEPC-Wasser	12,5 µl	12,5 µl	
Enzym	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Puffer	2 µl	2 µl	1 µl
Amplifikat (1-50 ng/µl)	5 µl	5 µl	8,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl	10 µl

4.9.2.1 Restriktion *Anaplasma phagocytophilum*

Zur Identifikation jedes in der PCR entstandenen 944 bp langen Amplifikates erfolgte die Inkubation der jeweiligen DNA-Probe mit dem Restriktionsenzym *SspI* zwischen 1 bis maximal 16 Stunden im Brutschrank bei 37 °C. Der Ansatz für den Restriktionsverdau ist Tab. 10 zu entnehmen. Die erwarteten Fragmentgrößen nach dem Restriktionsverdau lagen bei 633 bp und 311 bp und wurden anschließend in einem 2 %igen Agarosegel dargestellt. Zur weiteren Analyse erfolgte bei allen als positiv bestätigten Proben eine Sequenzierung. Die Schnittstelle des Restriktionsenzym *SspI* zeigt Tab. 11.

Tab. 11 *A. phagocytophilum*, *Rickettsia spp.*: Schnittstelle des Restriktionsenzym *SspI*.

Restriktionsenzym	Restriktionsschnittstelle
<i>SspI</i>	5'- AAT ATT - 3' 3'- TTA TAA - 5'

4.9.2.2 Restriktion *Rickettsia spp.*

Alle Amplifikate, die in der Gelelektrophorese in erwarteter Höhe von 340 bp eine Bande gezeigt hatten, wurden entsprechend dem in Tab. 10 dargestellten Ansatz mit dem Restriktionsenzym *SspI* bei 37 °C im Brutschrank zwischen einer und max. 16 Stunden inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau entstanden im positiven Fall Produkte von 217 bp und 123 bp Größe. Diese wurden in einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen. Als positiv bestätigte Proben wurden anschließend zur genauen Spezieszuordnung sequenziert.

4.9.2.3 Restriktion *Babesia* spp.

Die nach der PCR in der Gelelektrophorese als positiv gewerteten Fragmente von 284 bp Länge wurden zur Bestätigung einem Restriktionsverdau unterzogen. Dafür inkubierten sie entsprechend dem Ansatz in Tab. 10 mit dem Restriktionsenzym *AluI* bei 37 °C zwischen einer und maximal 16 Stunden im Brutschrank. Die im positiven Fall entstandenen Fragmente von 217 bp und 67 bp Länge wurden anschließend in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und zur genauen Zuordnung zu einer Spezies sequenziert. Die Tab. 12 zeigt die Schnittstelle des Restriktionsenzym *AluI*.

Tab. 12 *Babesia* spp.: Schnittstelle des Restriktionsenzym *AluI*.

Restriktionsenzym	Restriktionsschnittstelle
<i>AluI</i>	5'- AG CT - 3' 3'- TC GA - 5'

4.10 Sequenzierung

Um die Proben exakt einer Erregerspezies zuordnen zu können, erfolgte nach der Restriktion von allen als positiv getesteten Proben eine Sequenzierung. Die Extraktion der DNA aus den nach der PCR in entsprechender Höhe ausgeschnittenen und aufbewahrten Banden, erfolgte mit dem Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience GmbH). Die entsprechende DNA-Bande wurde mit 400 µl Extraktionspuffer im Thermomixer bei 60 °C für zehn Minuten inkubiert, die erhaltene Lösung anschließend in ein Filtertube pipettiert und eine Minute bei 14x1000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgten zwei Waschschrte mit zunächst 500 µl, anschließend 750 µl Waschpuffer und zwischenzeitlicher Zentrifugation. Anschließend wurde das DNA-Filtertube in ein neues 1,5 ml Auffanggefäß platziert und 30 µl DEPC-Wasser zugefügt, was zur Lösung der DNA vom Filter führte. In einer Vakuumzentrifuge erfolgte abschließend die Konzentrierung der Proben-DNA auf 10 µl.

Für die Sequenz-PCR wurden das DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare) angewandt und fluoreszenzmarkierte Desoxynukleotide eingesetzt. Der PCR-Ansatz sowie die Reaktionsbedingungen im Thermocycler können Tab. 13 und Tab. 14 entnommen werden.

Tab. 13 Pipettierschema für den PCR-Ansatz zur Sequenzierung.

Reagens	Volumen
Nukleotidpremix (= Nukleotide und Fluoreszenzfarbstoff)	4 µl
Primer	2 µl
DNA (1-50 ng/µl)	5 µl

Tab. 14 Sequenzierung: PCR- Bedingungen im Thermocycler.

	Temp.	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	20 sec
Annealing	55 °C	15 sec
Elongation	60 °C	1 min
25 Zyklen		

Im Anschluss wurde eine Ethanolfällung durchgeführt, indem 1 µl Natriumacetat und 38 µl 100 %iger Ethanol zum PCR-Produkt pipettiert und zehn Minuten zentrifugiert wurden. Nach Abgießen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 700 µl 70 %igen Ethanol. Auch dieser Überstand wurde abgegossen und es folgte eine erneute fünfminütige Zentrifugierung bei 10x1000 U/min. Danach wurde die Probe zum Trocknen in eine Vakuumzentrifuge gegeben. Nach Zugabe von 10 µl MegaBACE™ Loading solution wurde jedes Tube 20 Sekunden gevortext, zentrifugiert und abschließend in Sequenzubes gegeben. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) und wurde nach dem Verfahren nach Sanger (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Dieses auch als Kettenabbruchmethode bezeichnete Verfahren, nutzt fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide, sog. Terminatoren, die beim Einbau in den komplementär entstehenden DNA-Strang für einen Abbruch der Synthese sorgen. Mittels einer Polymerase, entsprechenden Primern und Oligonukleotiden wird ein der Matrize komplementärer Einzelstrang erstellt. Durch vier parallel ablaufende Teilreaktionen, die sich lediglich im Typ der jeweils verwendeten Didesoxynukleotide unterscheiden (Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin) entstehen durch die jeweils zuletzt eingebaute Base definierte Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Anhand der Kombination der Fluoreszenzmuster der vier Teilreaktionen lässt sich die Sequenz des amplifizierten DNA-Abschnitts rekonstruieren. Diese Auswertung erfolgt lasergestützt. Eine

entsprechende Software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) ermittelt aus den Daten die genaue Basenabfolge (Jansohn 2007). Der Vergleich mit bereits existierenden Sequenzen erfolgte über die Gendatenbank „Blast“ unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Einen Auszug aus der Sequenz einer mit *B. microti* infizierten aus dem Freiland stammenden Zecke veranschaulicht Abb. 11.

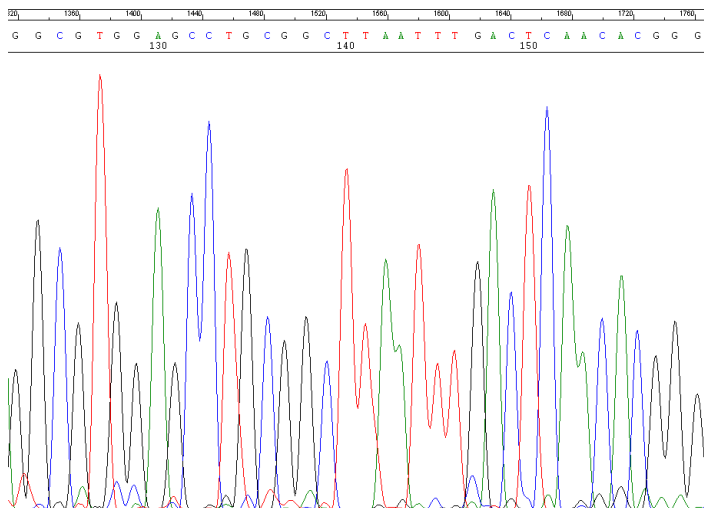


Abb. 11 Chromatogramm mit Auszug aus der 18S rDNA Sequenz von *B. microti*. Dargestellt ist ein Teil der durch Sequenzierung ermittelten Basenabfolge einer DNA-Probe, die eine Infektion mit *B. microti* nachweist. Farblich markiert sind die einzelnen Purin- und Pyrimidinbasen der DNA. (x-Achse: Zahl der Basenpaare, y-Achse: Fluoreszenzintensität; Adenin (A)-grün, Guanin (G)-schwarz, Cytosin (C)-blau, Thymin (T)-rot).

4.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm PASW Statistics 18 (Version 18.0). Zum Vergleich der Prävalenzen kam Fishers exakter Test auf der Basis von Kreuztabellen zur Anwendung. Als Signifikanzniveau galt $\alpha=5\%$. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, ein p -Wert $<0,001$ als höchst signifikant. Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Zum Vergleich der Mittelwerte von unabhängigen und normalverteilten Stichproben bei intervallskalierten Werten wurde der T-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Zum Mittelwertvergleich bei nicht normalverteilten intervallskalierten Werten wurden der U-Test nach Mann und Whitney bei zwei unabhängigen zu vergleichenden Stichproben, sowie der H-Test nach Kruskal und Wallis bei mehr als zwei zu vergleichenden unabhängigen Stichproben angewandt. Es wurden jeweils die exakten p -Werte berechnet.

4.12 Software

Zur Anwendung kam im Rahmen der Sequenzierung die Sequenzierungssoftware „Sequence Analysis“ 3.7. Zur Textverarbeitung wurden Microsoft Office Word 2007, zum Erstellen der Tabellen Microsoft Office Excel 2007, zum Erstellen der Grafiken PASW Statistics 18 (Version 18.0) und als Bildbearbeitungsprogramm Microsoft Office Powerpoint 2007 verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung ergab stadienabhängige Unterschiede im DNA-Gehalt der einzelnen Zecken, wobei der Morphologie entsprechend in den adulten Stadien die gemessene DNA-Menge am höchsten war. Die durchschnittlichen Mengen an extrahierter DNA in den einzelnen Entwicklungsstadien sind Tab. 15 zu entnehmen. Die Abb. 12 stellt die DNA-Werte grafisch mit Streuung dar.

Tab. 15 DNA-Gehalt der untersuchten Zecken nach Entwicklungsstadium. Der durchschnittliche DNA-Gehalt nimmt mit dem jeweils folgenden Entwicklungsstadium zu. Eine Ausnahme stellten die *I. ricinus* Männchen dar.

Stadium	Mittelwert ng/ μ l	Median ng/ μ l	Minimum ng/ μ l	Maximum ng/ μ l	Standardab- weichung
Larve	9,8	7,1	0,4	212,3	14,6
Nymphe	16,8	9	0,3	268,4	29,8
Weibchen	42,2	35,7	5,6	115,5	29,7
Männchen	14,3	14,6	2,8	31	8,3

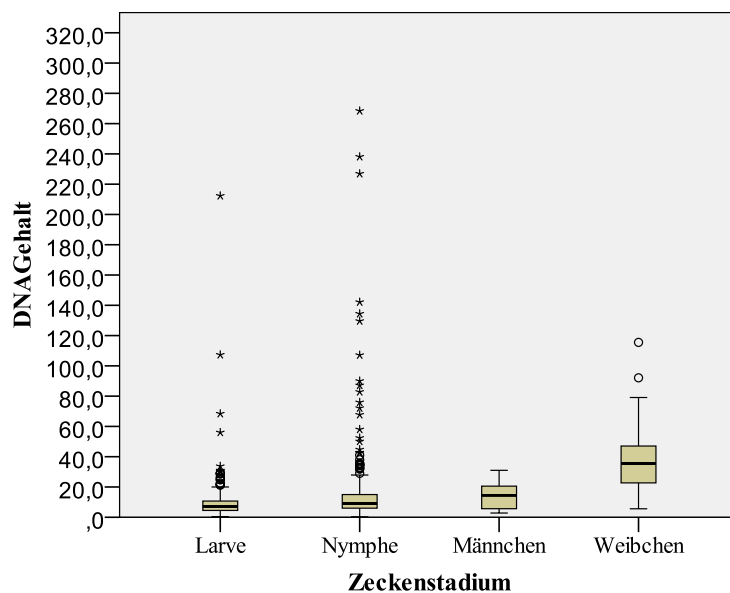


Abb. 12 Boxplotdiagramm des DNA-Gehalts der untersuchten *I. ricinus* Zecken. Deutlich zu erkennen ist der erhöhte DNA-Gehalt in adulten Weibchen, wo ohne Berücksichtigung der Ausreißer und Extremwerte auch die größte Streuung zu verzeichnen ist. ° Ausreißer, * Extremwert.

5.2 Fangzahlen und Gesamtprävalenzen

Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit 658 Zecken der Gattung *I. ricinus* untersucht. Dabei stammen 189 (28,7 %) der Zecken von Vögeln, 273 (41,5 %) von Kleinsäugetern und 196 (29,8 %) als wirtssuchende Zecken aus dem Freiland. Der Anteil der untersuchten Larven lag bei 48,8 % (321/658), der der Nymphen bei 45,7 % (301/658) und zu 5,5 % (36/658) wurden Adulte in die Studie einbezogen.

13,1 % (86/658) der Zecken waren mit mindestens einem der drei untersuchten Erreger infiziert. Mit 17,5 % (33/189) waren signifikant mehr von Vögeln stammende *I. ricinus* mit Pathogenen befallen als an Mäusen parasitierende Zecken, bei denen Infektionen zu 9,2 % (25/273) vorkamen ($p=0,010$). In wirtssuchenden Zecken konnten bei 14,3 % (28/196) Pathogene nachgewiesen werden. Der Anteil der infizierten Larven lag mit 10,6 % (34/321) signifikant unter dem der infizierten Nymphen mit 16,6 % (50/301) ($p=0,034$). Bei Adulten wurde in 5,6 % (2/36) DNA der untersuchten Erreger detektiert. Infektionen mit Anaplasmen traten bei 1,4 % (9/658) der Zecken auf, Rickettsien wurden in 2,6 % (17/658) nachgewiesen und Babesien-DNA in 9,7 % (64/658) der Zecken gefunden. Koinfektionen mit mehr als einem Erreger ergaben sich zu 0,6 % (4/658). In Abb. 13 sind die aufgetretenen Infektionen veranschaulicht.

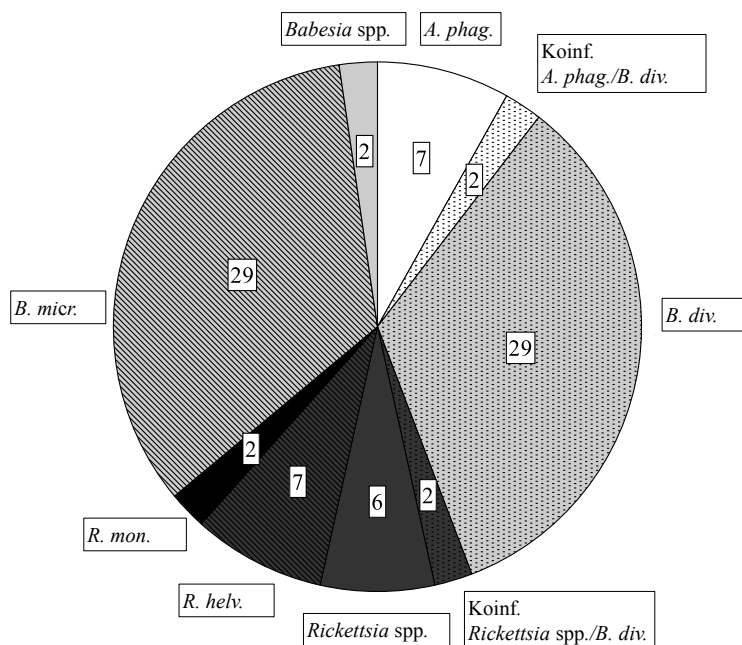


Abb. 13 Prävalenzen von *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. in *I. ricinus* Zecken aus Reifenstein. Es traten insgesamt 90 Infektionen in 86 Zecken auf. Die Werte in der Grafik stellen die Absolutzahlen dar. Die schraffierten Areale um den Anteil an *B. divergens* geben die Zahl der Zecken mit Koinfektionen wieder. *A.*-*Anaplasma*, *B.*-*Babesia*, *R.*-*Rickettsia*, *mon.*-*monacensis*, *helv.*-*helvetica*, *micr.*-*microti*, *div.*-*divergens*, *phag.*-*phagocytophilum*, *spp.*-species pluralis, Koinf.-Koinfektionen.

5.3 PCR, RFLP, Sequenzierung

5.3.1 *Anaplasma phagocytophilum*

Zum Nachweis von *A. phagocytophilum* wurde ein Teil des 16S rRNA Gens mittels PCR amplifiziert (s. Kap. 4.7.2, S. 32). In der Gelelektrophorese zeigte sich bei 13 der 658 Proben eine Bande bei 944 bp wie in Abb. 14 veranschaulicht. Allerdings war diese in einigen Fällen nur sehr schwach positiv. Um möglichst alle Infektionen zu erfassen, wurde die Positivität großzügig bewertet und die entsprechenden Proben einem anschließenden Restriktionsverdau zugeführt, um *Anaplasma* spp. in der Probe zu bestätigen. Einen Überblick über die Zahl der den jeweiligen Analyseschritten zugeführten Proben gibt Abb. 15.

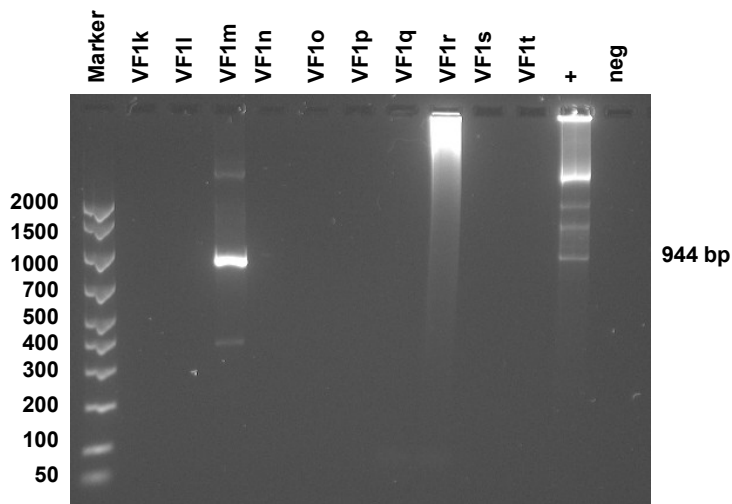


Abb. 14 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation des 16S rRNA Gens von *A. phagocytophilum*. Die Proben VF 1k bis VF 1t wurden aufgetragen. Auf Höhe von 944 bp zeigt sich bei VF 1m eine für *Anaplasma* spp. typische Bande, die in gleicher Höhe wie die mitgeführte Positivkontrolle (+) liegt. Die zusätzlich aufgetretenen schwächeren Banden entsprechen unspezifischen Primerreaktionen. Die zusätzlichen Banden im Bereich der Positivkontrolle entstanden durch Plasmidreste. Links sind die entsprechenden Kontrollbanden (Einheit: bp) des Markers aufgeführt, neg $\hat{=}$ Negativkontrolle, bp $\hat{=}$ Basenpaare.

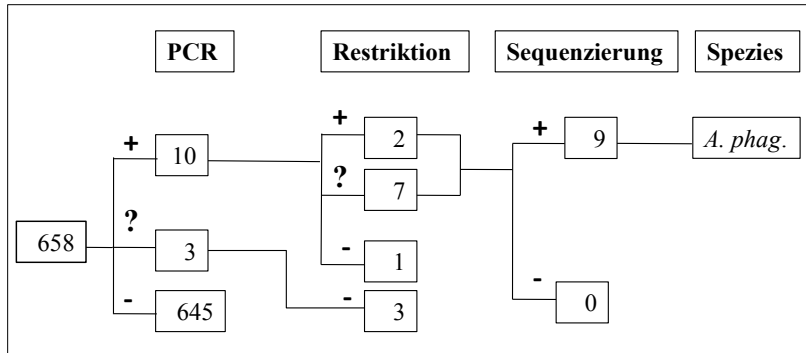


Abb. 15 Flußdiagramm zur Bestimmung von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* Zecken. Insgesamt konnte in 9 der 658 Proben nach PCR, Restriktion und Sequenzierung *A. phagocytophilum* nachgewiesen werden. + ≙ positiv, - ≙ negativ, ? ≙ uneindeutig, *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*.

Von allen 13 nach der PCR als positiv gewerteten Proben erfolgte eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym *SspI*, die Banden in Höhe von 633 bp und 311 bp erwarten ließ wie in Abb. 16 nachzuvollziehen. Dabei war die Restriktion für vier Proben eindeutig negativ, was durch die Durchführung des Restriktionsverdaus auch bei Proben, die in der PCR nicht eindeutig positiv erschienen, zurückzuführen ist. Zur Speziesdifferenzierung und um uneindeutige Ergebnisse zu verifizieren, wurde von den zwei in der Restriktion eindeutig positiven sowie den sieben fraglich positiven Proben eine Sequenzierung durchgeführt (s. Kap. 6.6, S. 94). Diese ergab bei allen neun Proben eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem *A. phagocytophilum* Isolat der NCBI-Datenbank (Access. No. AJ313513).

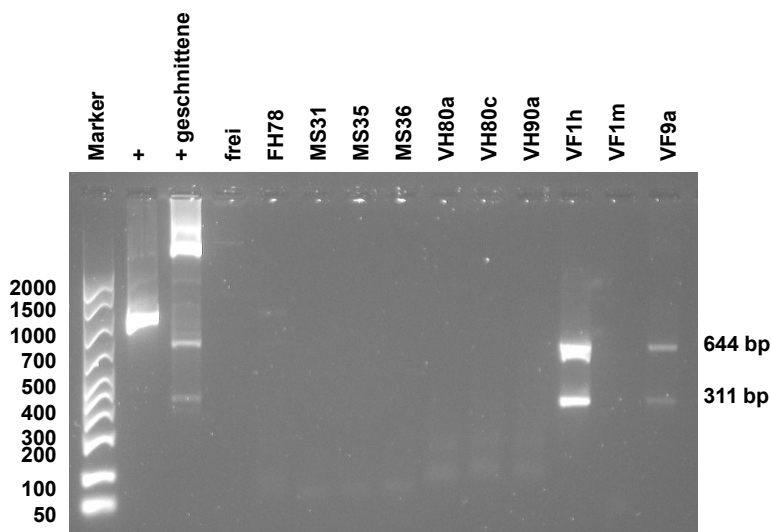


Abb. 16 Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus dem Restriktionsverdau mit dem Enzym *SspI*. Die Proben VF 1h und VF 9a sind eindeutig als positiv zu identifizieren. Links sind die entsprechenden Kontrollbanden (Einheit: bp) des Markers aufgeführt, + ≙ Positivkontrolle, bp ≙ Basenpaare.

5.3.2 *Rickettsia* spp.

Zum Nachweis von *Rickettsia* spp. wurde ein Teil des Zitratsynthasegens *gltA* mittels PCR vervielfältigt (s. Kap. 4.7.2, S. 32). Die PCR ergab bei 34 von 658 Proben ein 340 bp langes Fragment wie Abb. 17 veranschaulicht. Von allen 34 in der PCR als positiv gewerteten Proben wurde nachfolgend ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *SspI* durchgeführt, der im positiven Fall Fragmente von 217 bp und 123 bp Länge ergab, die in Abb. 18 dargestellt sind. Dabei erwiesen sich 16 Proben als negativ, elf als uneindeutig und sieben als positiv. Die Abb. 19 gibt einen Überblick über die den jeweiligen Analyseschritten zugeführten Proben.

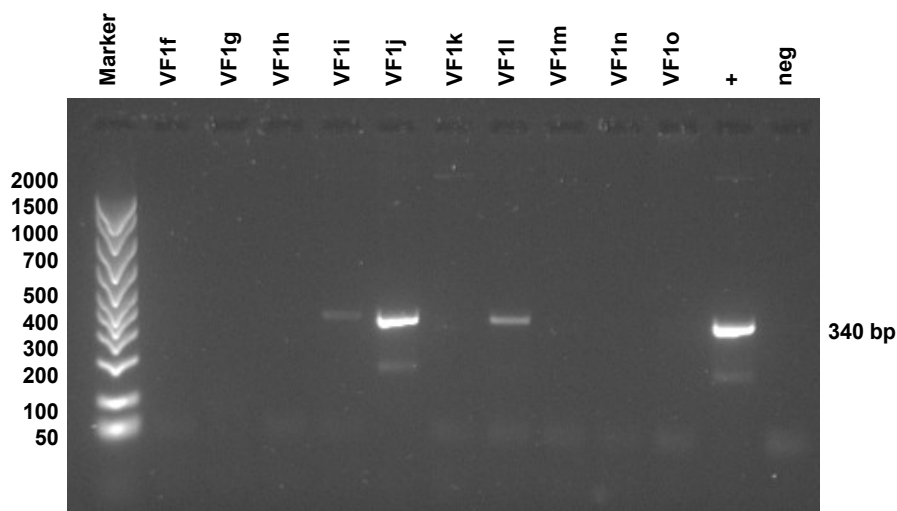


Abb. 17 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation des Zitratsynthasegens *gltA* von *Rickettsia* spp. Es wurden die Proben VF 1f bis VF 1o aufgetragen. Die Proben VF 1i, VF 1j sowie VF 1l zeigen positive Banden in erwarteter Höhe bei 340 bp. Banden in Höhe von 50 bp oder darunter stellen Primerdimere dar. Links sind die entsprechenden Kontrollbanden (Einheit: bp) des Markers aufgeführt, + $\hat{=}$ Positivkontrolle, neg $\hat{=}$ Negativkontrolle, bp $\hat{=}$ Basenpaare.

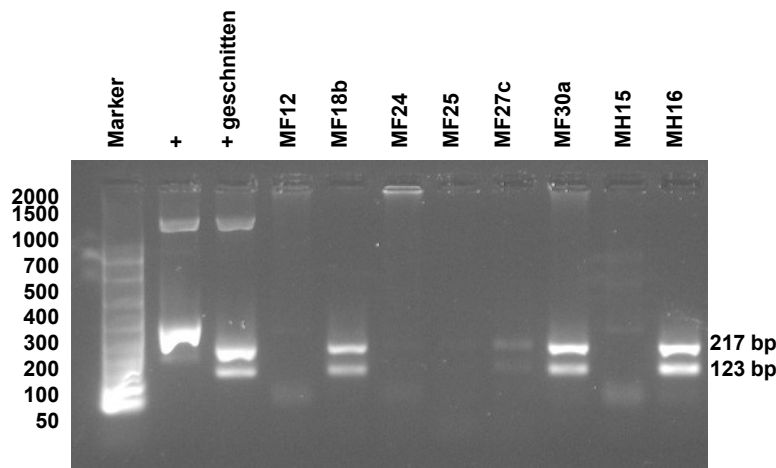


Abb. 18 Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsprodukte aus dem Verdau mit *SspI*. Die Proben MF 18b, MF 27c, MF 30a sowie MH 16 wurden vom Restriktionsenzym geschnitten und zeigen Banden in den erwarteten Höhen bei 217 bp und 123 bp. Die zusätzlichen schwächeren Banden entsprechen unspezifischen Primerreaktionen. Die zusätzlichen Banden im Bereich der Positivkontrolle (+) entstanden durch Plasmidreste. Links sind die entsprechenden Kontrollbanden (Einheit: bp) des Markers aufgeführt, bp = Basenpaare.

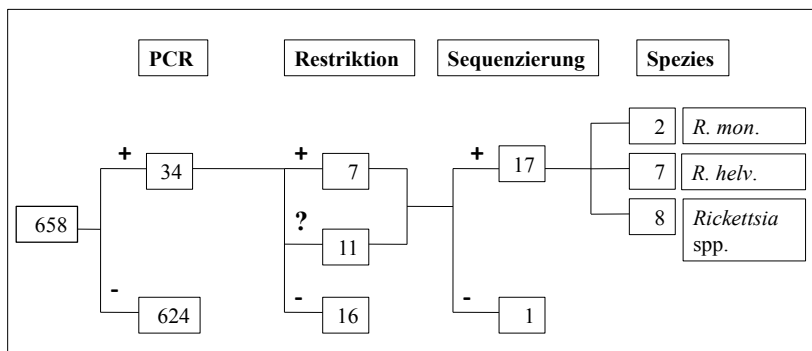


Abb. 19 Flußdiagramm zur Bestimmung von *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* Zecken. Insgesamt konnte in 17 der 658 Proben nach PCR, Restriktion und Sequenzierung *Rickettsia* spp. nachgewiesen werden. + = positiv, - = negativ, ? = uneindeutig. *R.*-*Rickettsia*, *mon.*-*monacensis*, *helv.*-*helvetica*, *spp.*-*species pluralis*.

Um die genaue Spezies zu differenzieren und uneindeutige Ergebnisse zu verifizieren, erfolgte im Anschluss eine Sequenzierung der in der Restriktion sieben positiven und elf uneindeutigen Ergebnisse. Dabei erwiesen sich 17 der 18 Amplifikate als positiv. Die Analyse ergab 99-100 % Übereinstimmung für sieben Proben mit dem *R. helvetica* Stamm Ip-4 (Access. No. DQ131912), für zwei Proben mit dem *R. monacensis* Isolat IrR/München (Access. No. DQ 100163) und bei acht Proben konnte lediglich *Rickettsia* spp. klassifiziert werden (s. Kap. 6.6, S. 94).

5.3.3 *Babesia* spp.

Um DNA von *Babesia* spp. nachzuweisen, wurde ein Teil des 18S rRNA Gens mittels PCR amplifiziert (s. Kap. 4.7.2, S. 32). Im positiven Fall zeigte sich in der gelelektrophoretischen Auftrennung in Höhe von 284 bp eine Bande wie in Abb. 20 dargestellt. Die PCR war sehr sensitiv, sodass sich auch unspezifische Banden in der Gelelektrophorese darstellten. Diese wurden in uneindeutigen Fällen großzügig als positiv bewertet, sodass sich insgesamt 124 der 658 in der PCR als positiv erwiesen. Einen Überblick über die den jeweiligen Analyseschritten zugeführten Proben gibt Abb. 21.

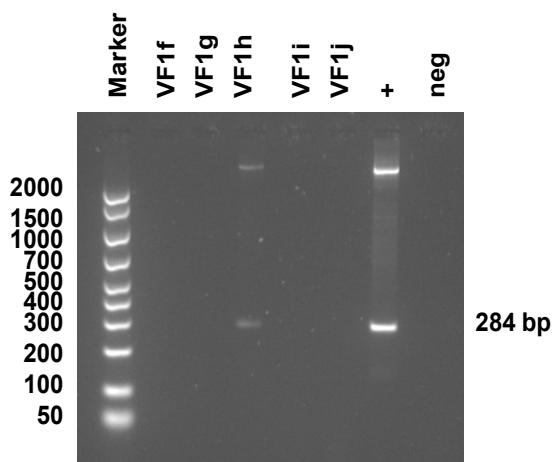


Abb. 20 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation des 18S rRNA Gens zum Nachweis von *Babesia* spp. Die Proben VF 1f bis VF 1j wurden aufgetragen. Dabei zeigt VF 1h in Höhe von 284 bp eine positive Bande. Die beiden zusätzlichen oberen Banden entsprechen unspezifischen Primerreaktionen (VF1h) bzw. einem Plasmidrest (Positivkontrolle). Links sind die entsprechenden Kontrollbanden (Einheit: bp) des Markers aufgeführt, + = Positivkontrolle, neg = Negativkontrolle, bp = Basenpaare.

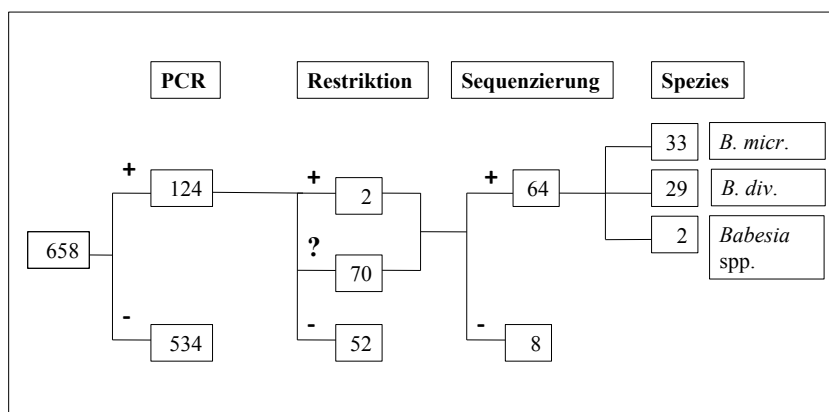


Abb. 21 Flußdiagramm zur Bestimmung von *Babesia* spp. in *I. ricinus* Zecken. Insgesamt konnten in 64 der 658 Proben nach PCR, Restriktion und Sequenzierung *Babesia* spp. nachgewiesen werden. + = positiv, - = negativ, ? = uneindeutig, *B.-Babesia*, *micr.-microti*, *div.-divergens*, *spp.-species pluralis*.

Von allen 124 in der PCR positiven Proben wurde eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym *AluI* durchgeführt. Die erwarteten Banden in Höhe von 217 bp und 67 bp zeigt Abb. 22. Die Restriktion ergab bei 52 Proben ein negatives Ergebnis, zwei waren eindeutig positiv und 70 Amplifikate uneindeutig. Die hohe Zahl an negativen Restriktionsergebnissen ist durch die in der PCR fraglich positiven Proben bedingt, die mit in die Restriktion einbezogen wurden. Die anschließende Sequenzierung der 72 Proben ergab acht negative und 64 positive Proben (s. Abb. 21, S. 51). Mit 99-100 %iger Übereinstimmung mit den Referenzstämmen der NCBI-Datenbank wurde bei 33 dieser Proben *B. microti* (Access. No. AY693840), bei 29 *B. divergens* als Spezies identifiziert (Access. No. AY789076). 2 Proben wurden lediglich als *Babesia* spp. klassifiziert (s. Kap. 6.6, S. 94).

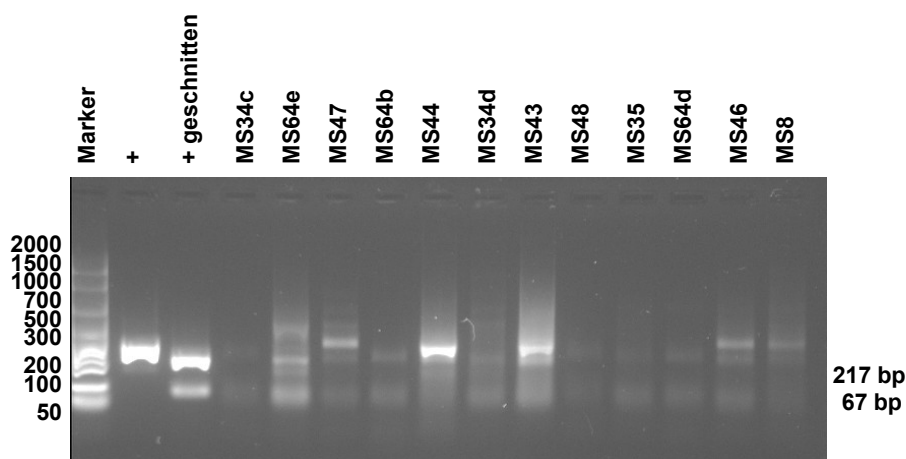


Abb. 22 Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus dem Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI*. Die Proben MS 64e, MS 44, MS 43, MS 48 und MS 35 erwiesen sich in der anschließenden Sequenzierung als positiv. Links sind die entsprechenden Kontrollbanden (Einheit: bp) des Markers aufgeführt, + \triangleq Positivkontrolle, bp \triangleq Basenpaare.

5.4 *I. ricinus* von Vögeln

5.4.1 Infestationsrate

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum in Reifenstein 64 Vögel mindestens zwölf unterschiedlicher Arten gefangen, die mit 211 *I. ricinus* Zecken infestiert waren. Bei sechs Tieren konnten die Angaben zur Vogelart vom Beringer nicht zur Verfügung gestellt werden. Da nicht alle gefangenen Vögel mit Zecken infestiert waren und nur ausreichend gesogene Exemplare in die Untersuchung einbezogen wurden, wurden lediglich 189 dieser an den Vögeln parasitierenden *I. ricinus* im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Diese stammten von 56 Vögeln mindestens elf unterschiedlicher Spezies. Alle involvierten Vogelarten gehören zur Ordnung der Sperlingsvögel (Passeriformes) und sind, abgesehen von der Kohlmeise (*Parus major*), Zugvögel bzw. Teilzieher (Franke 2010). Als Teilzieher gelten Vogelarten, bei denen Teile der Population in ihrem Brutgebiet überwintern während andere in wärmere Gebiete ziehen (Gatter 2000). Die untersuchten Vogelarten sowie deren Infestation mit den jeweils unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16 Überblick über die Artenverteilung und Infestationszahlen mit *I. ricinus* der in Reifenstein gefangenen Vögel. Am häufigsten gefangen wurden Amseln, die auch die stärkste Infestation aufwiesen. La-Larven, Ny-Nymphen, n.i.-nicht identifizierbar, * Fangzahlen zu gering für statistische Aussagen, Ø Durchschnitt, n.i.-Vögel zu denen der Beringer keine Angabe bezüglich der Art machen konnte.

Vogelart	Wissenschaftlicher Name	Individuenzahl	Infestation			
			Gesamt	La	Ny	Ø
Amsel	<i>Turdus merula</i>	24	101	39	62	4,2
Blaumeise	<i>Cyanistes caeruleus</i>	1	1	0	1	*
Gimpel	<i>Pyrrhula modularis</i>	3	6	3	3	*
Heckenbraunelle	<i>Prunella modularis</i>	1	1	0	1	*
Kohlmeise	<i>Parus major</i>	3	5	1	4	*
Rotkehlchen	<i>Erithacus rubecula</i>	7	11	5	6	1,6
Singdrossel	<i>Turdus philomelos</i>	6	41	11	30	6,8
Sumpfrohrsänger	<i>Acrocephalus palustris</i>	1	2	2	0	*
Teichrohrsänger	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	1	1	0	1	*
Zaunkönig	<i>Troglodytes troglodytes</i>	2	2	1	1	*
Zilpzalp	<i>Phylloscopus collybita</i>	1	1	0	1	*
n.i.	n.i.	6	17	1	16	2,8
Gesamt		56	189	63	126	3,4

Die mittlere Infestationszahl aller untersuchten Vögel betrug 3,4 Zecken pro Tier, wobei die Vögel insgesamt mit 63 Larven (33,3 %) und 126 Nymphen (66,7 %) infestiert waren. Adulte Zecken wurden an den untersuchten Vögeln nicht gefunden. Die durchschnittliche Infestation war im Frühling laut Mann-Whitney-Test mit 5,1 Zecken pro Vogel signifikant höher ($p=0,013$) als im Herbst (\bar{x} 2,2), nicht aber im Vergleich zum Sommer (\bar{x} 2,8). Die Tab. 17 gibt einen Überblick über die jahreszeitlich unterschiedlichen Infestationszahlen.

Tab. 17 Infestationszahlen der untersuchten Vögel in Abhängigkeit von der Jahreszeit. Deutlich werden die hohen Schwankungen im Befall mit *I. ricinus* zwischen den einzelnen Individuen sowie die durchschnittlich niedrigeren Befallszahlen im Herbst. N-Anzahl, Frühling (01.05.-19.06.2007), Sommer (09.07.-16.08.2007), Herbst (26.08.-14.10.2007).

Jahreszeit	N	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- Abweichung
Frühling	18	5,06	3,00	1	20	5,093
Sommer	23	2,83	2,00	1	8	2,081
Herbst	15	2,20	1,00	1	7	2,077
Gesamt	56	3,38	2,00	1	20	3,504

Bei ausschließlicher Betrachtung der Infestation mit Nymphen ergab sich eine signifikant höhere Befallsrate im Frühling (\bar{x} 3,9) gegenüber dem Herbst (\bar{x} 2,1) ($p=0,010$). Insgesamt waren Singdrosseln (\bar{x} 6,8, $p=0,006$) und Amseln (\bar{x} 4,2, $p=0,02$) signifikant häufiger mit Zecken befallen als Rotkehlchen (\bar{x} 1,6). Aufgrund nur geringer Individuenfangzahlen der anderen 8 Vogelarten sind über deren Infestationszahlen keine statistisch relevanten Aussagen zu treffen. Infizierte Zecken fanden sich bei insgesamt 33,2 % (19/56) der untersuchten Vögel, wobei der Anteil der Amseln mit 19,6 % am größten war (11/56).

5.4.2 Infektionen mit Anaplasmen

Insgesamt waren 3,2 % (6/189) der an Vögeln parasitierenden *I. ricinus* Zecken mit *A. phagocytophilum* infiziert, davon zwei Larven (3,1 %) und vier Nymphen (3,2 %). Diese stammten von einer Amsel und drei Rotkehlchen. Somit ergaben sich bei 7,1 % (4/56) der untersuchten Vögel Infektionen mit diesem Erreger. Eine Amsel und ein Rotkehlchen trugen jeweils zwei mit Anaplasmen infizierte Zecken, von denen eine von der Amsel stammende Larve zusätzlich mit *B. divergens* koinfiziert war. Die Infektionen traten bei zwei der im Frühling und bei zwei der im Herbst entnommenen Zecken auf. In den vom Sommer stammenden vogelasso-

ziierten Zecken konnten keine Anaplasmeninfektionen nachgewiesen werden. So waren bei im Herbst entnommenen Zecken (9,1 %) signifikant mehr Anaplasmeninfektionen zu verzeichnen als im Sommer (0 %) ($p=0,036$). Einen Überblick über die Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in an Vögeln parasitierenden Zecken gibt Tab. 18.

Tab. 18 Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* von Vögeln. Infest.-Infestation, ges.-gesamt, Koinf.-Koinfektion, Inf.-Infektionen, La-Larve, Ny-Nymphe, VF-Frühling, VH-Herbst, *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, *B. div.*-*Babesia divergens*, *R.-Rickettsia*, *mon.-monacensis*, *helv.-helvetica*. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet den Vogel, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zeckenzahl.

Zecke	Vogelart	Stadium	Infest. Vogel ges.	Erreger	Koinf.	weitere Inf.
VF1h	Amsel	La	11 La, 9 Ny	<i>A. phag.</i>	<i>B. div.</i>	2 Ny (<i>R. mon.</i>)
VF1m		Ny		<i>A. phag.</i>		1 Ny (<i>R. helv.</i>)
VF9a	Rotkehlchen	Ny	2 Ny	<i>A. phag.</i>		0
VH80a	Rotkehlchen	Ny	3 Ny	<i>A. phag.</i>		0
VH80c		Ny		<i>A. phag.</i>		
VH90a	Rotkehlchen	La	2 La	<i>A. phag.</i>		0

5.4.3 Infektionen mit Rickettsien

Insgesamt konnte in 2,1 % (4/189) der von Vögeln stammenden Zecken Rickettsien DNA detektiert werden. Alle Infektionen fanden sich in an zwei Amseln parasitierenden Nymphen, die im Frühling gesammelt wurden. Somit waren 3,6 % (2/56) der untersuchten Vögel positiv für diese Pathogene. Die Klassifizierung per Sequenzanalyse ergab jeweils eine Infektion mit *R. helvetica* und *Rickettsia* spp. sowie zwei mit *R. monacensis*. Eine Nymphe wies eine Koinfektion mit *Rickettsia* spp. und *B. divergens* auf. Bei einer Amsel konnten zwei mit *R. monacensis* und eine mit *R. helvetica* infizierte Nymphe nachgewiesen werden. Die Tab. 19 gibt einen Überblick über die mit den verschiedenen Rickettsienspezies infizierten an Amseln parasitierenden Zecken.

Tab. 19 Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in von Vögeln stammenden *I. ricinus* Zecken. Infest.-Infestation, Koinf.-Koinfektion, Inf.-Infektionen, La-Larve, Ny-Nymphe, VF-Frühling, *A. phag.-Anaplasma phagocytophilum*, *B.-Babesia*, *R.-Rickettsia*, *div.-divergens*, *micr.-microti*, *mon.-monacensis*, *helv.-helvetica*, spp.-species pluralis. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet den Vogel, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zeckenzahl.

Zecke	Vogelart	Stadium	Erreger	Infest.	Koinf.	weitere Inf.
VF1i	Amsel	Ny	<i>R. mon.</i>	11 La, 9 Ny		1 La (<i>A. phag.</i> , <i>B. div.</i>)
VF1j		Ny	<i>R. mon.</i>			1 Ny (<i>A. phag.</i>)
VF1l		Ny	<i>R. helv.</i>			
VF25c	Amsel	Ny	<i>Rickettsia</i> spp.	1 La, 3 Ny	<i>B. div.</i>	1 La (<i>B. micr.</i>)

5.4.4 Infektionen mit Babesien

Die untersuchten von Vögeln stammenden Zecken waren zu 13,2 % (25/189) mit Babesien infiziert, davon 12 Larven (19 %) und 13 Nymphen (10,3 %). Die infizierten Zecken stammten von 17 verschiedenen Vögeln mindestens vier unterschiedlicher Arten, was einer Infektionsrate von 30,4 % (17/56) der untersuchten Vögel mit Babesien entspricht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Infektionsraten zwischen den zu verschiedenen Jahreszeiten entnommenen Zecken ($p > 0,317$). Der Vergleich mit der NCBI Datenbank zur Sequenzanalyse ergab acht Infektionen mit *B. microti* (4,2%), davon vier in Larven und vier in Nymphen. Sechzehnmal konnte *B. divergens* (8,5 %) als Erreger identifiziert werden, jeweils in acht Larven und acht Nymphen. In einer Zecke konnte *Babesia* spp. (0,5 %) detektiert werden. Koinfektionen von *B. divergens* mit *A. phagocytophilum* traten in einer von einer Amsel stammenden Larve auf sowie mit *Rickettsia* spp. in einer an einer Amsel parasitierenden Nymphe. Insgesamt trugen fünf Vögel mehr als eine mit Babesien infizierte Zecke, davon vier Amseln und ein Vogel, dessen Art vom Beringer nicht zugeordnet werden konnte. Bei zwei Amseln konnten darüberhinaus auch mit anderen Erregern befallene Zecken nachgewiesen werden (s. Tab. 27, S. 67). Die Tab. 20 gibt einen Überblick über die bei von Vögeln stammenden Zecken aufgetretenen Babesieninfektionen.

Tab. 20 Prävalenzen von *Babesia* spp. in von Vögeln stammenden *I. ricinus*. Infest.-Infestation, Koinf.-Koinfektion, Inf.-Infektionen, La-Larve, Ny-Nymphe, VF-Frühling, VS-Sommer, VH-Herbst, *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, *B.*-*Babesia*, *R.*-*Rickettsia*, *div.*-*divergens*, *micr.*-*microti*, *mon.*-*monacensis*, *helv.*-*helvetica*, spp.-species pluralis, ? - Angabe zur Vogelart vom Beringer nicht zur Verfügung gestellt, neg-negativ, Prozentangaben in Klammern. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet den Vogel, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zeckenzahl.

Zecke	Vogelart	Stadium	Erreger	Infest.	Koinf.	weitere Inf.
VF1h	Amsel	La	<i>B. div.</i>	11 La, 9 Ny	<i>A. phag.</i>	2 Ny (<i>R. mon.</i>) 1 Ny (<i>R. helv.</i>) 1 Ny (<i>A. phag.</i>)
VF11a	Amsel	La	<i>B. div.</i>	5 La, 5 Ny		0
VF11d		La	<i>B. micr.</i>			
VF11f		Ny	<i>B. div.</i>			
VF11g		La	<i>B. div.</i>			
VF12f	Amsel	La	<i>B. micr.</i>	4 La, 2 Ny		0
VF25c	Amsel	Ny	<i>B. div.</i>	1 La, 3 Ny	<i>Rickettsia</i> spp.	0
VF25d		La	<i>B. micr.</i>			
VS56	Amsel	Ny	<i>Babesia</i> spp.	1 Ny		0
VS59a	Amsel	La	<i>B. div.</i>	1 La, 5 Ny		0
VS60a	Amsel	Ny	<i>B. div.</i>	1 La, 4 Ny		0
VS71b	Amsel	Ny	<i>B. div.</i>	1 La, 1 Ny		0
VS72a	Amsel	Ny	<i>B. micr.</i>	1 La, 6 Ny		0
VS72f		Ny	<i>B. div.</i>			
VH95c	Amsel	La	<i>B. div.</i>	5 La, 1 Ny		0
VH95d		La	<i>B. div.</i>			
VH95f		La	<i>B. div.</i>			
VH96	Amsel	Ny	<i>B. div.</i>	1 Ny		0
Gesamt	11 Amseln (19,6)	10 La	13 <i>B. div.</i>	30 La		
Amseln		8 Ny	4 <i>B. micr.</i>	38 Ny		
1 <i>Babesia</i> spp.						
VF10b	Sumpfrohrsänger	La	<i>B. div.</i>	2 La		1 La (neg.)
VF13a	?	Ny	<i>B. micr.</i>	2 Ny		0
VF13b		Ny	<i>B. div.</i>			
VS43b	Gimpel	La	<i>B. micr.</i>	2 La		0
VH92f	?	Ny	<i>B. div.</i>	7 Ny		0
VH104	Heckenbraunelle	Ny	<i>B. micr.</i>	1 Ny		0
VH107	?	Ny	<i>B. micr.</i>	1 Ny		0
Gesamt	17 Vögel (30,4)	12 La	16 <i>B. div.</i> (8,5)	34 La		
		13 Ny	8 <i>B. micr.</i> (4,2)	49 Ny		
1 <i>Babesia</i> spp. (0,5)						

5.5 *I. ricinus* von Kleinsäufern

5.5.1 Infestationsrate

Insgesamt wurden in Reifenstein 207 Kleinsäuger zwischen Mai und Oktober 2007 gefangen, davon 108 Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) und 99 Rötelmäuse (*Myodes glareolus*). Von diesen wurden 627 Zecken der Gattung *I. ricinus* entnommen. Da nur ausreichend gesogene Zecken in die Untersuchung einbezogen wurden (Hinterleib mindestens 1 mm) und 354 Larven einen sehr geringen Saugzustand aufwiesen, wurden für die vorliegende Arbeit 273 *I. ricinus* Zecken von insgesamt 166 Kleinsäufern untersucht. Von den untersuchten Zecken stammten 166 von Gelbhalsmäusen und 107 von Rötelmäusen. Der Anteil an Larven lag mit 94,5 % (258/273) deutlich über dem an Nymphen mit 4,8 % (13/273) und dem von Adulten, der 0,7 % (2/273) betrug. Die Tab. 21 gibt einen Überblick über die untersuchten *I. ricinus* Zecken von Kleinsäufern.

Tab. 21 Überblick über den Ursprung und die Stadienverteilung der untersuchten *I. ricinus* Zecken von Kleinsäufern aus Reifenstein. La-Larven, Ny-Nymphen, Ad-Adulte.

Mausart	Wissenschaftlicher Name	Individuenzahl	Infestation			
			Gesamt	La	Ny	Ad
Gelbhalsmaus	<i>Apodemus flavicollis</i>	93	166	160	6	0
Rötelmaus	<i>Myodes glareolus</i>	73	107	98	7	2
Gesamt		166	273	258	13	2

Die durchschnittliche Infestation der 166 Kleinsäuger einschließlich des Befalls mit nur gering gesogenen Larven, die nicht mit in die Untersuchung eingingen, lag bei 3,5 Zecken pro Tier. Gelbhalsmäuse waren durchschnittlich mit 3,8 Zecken infestiert, Rötelmäuse mit 3,1. Dieser Unterschied ergab im T-Test keine Signifikanz ($p=0,179$) ebensowenig wie die separate Betrachtung der Infestation beider Mäusearten mit unterschiedlichen *I. ricinus* Entwicklungsstadien ($p>0,05$). Die Infestationszahlen beider Kleinsäugerarten verdeutlicht Abb. 23.

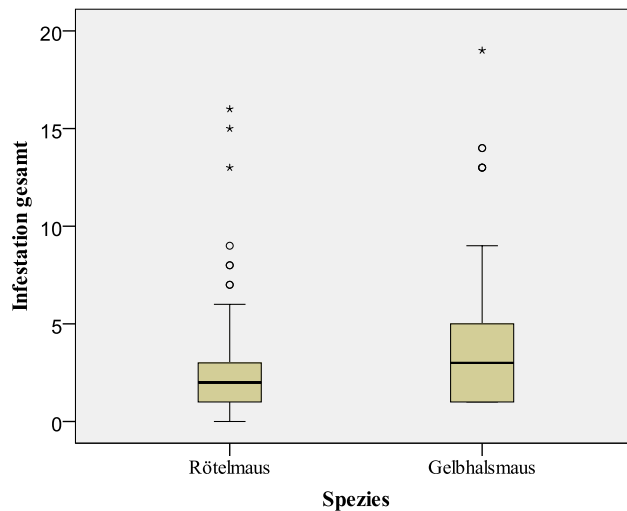


Abb. 23 Boxplotdiagramm der Infestationsraten von Kleinsäugern mit *I. ricinus*. Individuenzahl, Median und die mittlere Infestation sind bei Gelbhalsmäusen etwas höher. ° Ausreißer, * Extremwert.

Jedoch ergab sich im saisonalen Vergleich, dass beide Kleinsäuger im Frühling mit signifikant mehr Zecken infestiert waren (\bar{X} 5,3) als im Sommer (\bar{X} 2,1; $p < 0,001$) und Herbst (\bar{X} 1,9; $p < 0,001$). Im Frühling wiesen außerdem Gelbhalsmäuse mit durchschnittlich 6,7 Zecken signifikant höhere durchschnittliche Infestationszahlen auf als Rötelmäuse (\bar{X} 4,1; $p = 0,001$) während im Sommer und Herbst keine deutlichen Unterschiede in den Infestationszahlen zwischen beiden Arten zu beobachten waren wie Abb. 24 zeigt. Insgesamt waren 13,9 % (23/166) der untersuchten Kleinsäuger mit infizierten Zecken infestiert.

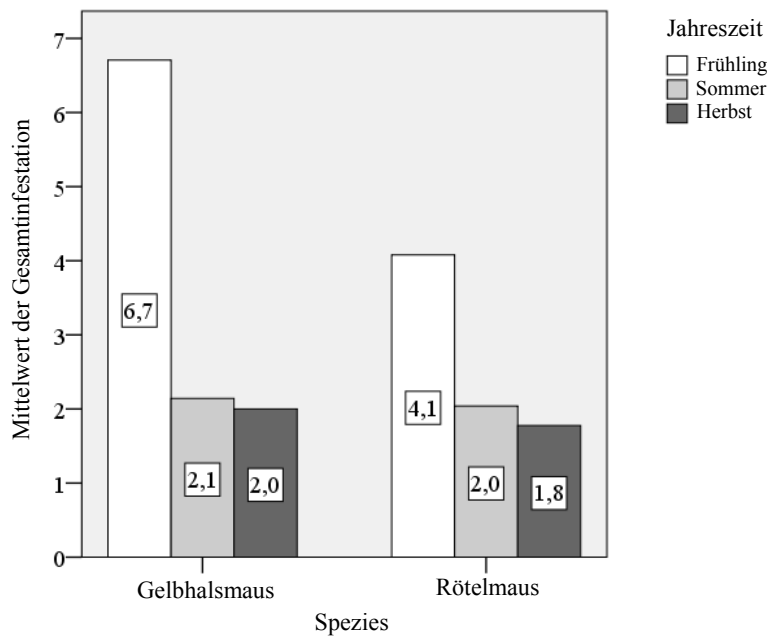


Abb. 24 Durchschnittliche Infestation der Kleinsäugerspezies mit *I. ricinus* in Abhängigkeit von der Jahreszeit. Die deutlichsten Unterschiede in den Infestationszahlen zwischen beiden Spezies ergaben sich im Frühling. Frühling (01.05.-19.06.2007), Sommer (09.07.-16.08.2007), Herbst (26.08.-14.10.2007).

5.5.2 Infektionen mit Anaplasmen

Die Prävalenz von an Kleinsäugern parasitierenden Zecken mit *A. phagocytophilum* betrug 1,1 % (3/273). Alle drei dieser infizierten *I. ricinus* Zecken waren Larven und stammten von im Sommer gefangenen Gelbhalsmäusen (3,2 %). Bei Rötelmäusen traten keine Infektionen mit Anaplasmen auf. Insgesamt lag daher die Infektionsrate für *A. phagocytophilum* bei 1,8 % (3/166) aller untersuchten Kleinsäuger. In einer der Larven wurde eine Koinfektion mit *B. divergens* detektiert. Die Tab. 22 zeigt die aufgetretenen Infektionen mit Anaplasmen im Überblick.

Tab. 22 Prävalenz von *A. phagocytophilum* in an Kleinsäugern parasitierenden Zecken aus Reifenstein. Koinf.-Koinfektion, La-Larve, MS-Sommer, *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, *B. div.*-*Babesia divergens*. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet den Kleinsäuger, von dem sie abgesammelt wurde.

Zecke	Kleinsäugerart	Stadium	Erreger	Koinf.	weitere Zecken
MS31	Gelbhalsmaus	La	<i>A. phag.</i>		0
MS35	Gelbhalsmaus	La	<i>A. phag.</i>	<i>B. div.</i>	0
MS36	Gelbhalsmaus	La	<i>A. phag.</i>		0

5.5.3 Infektionen mit Rickettsien

Bei 1,8 % (5/273) der von Kleinsäufern stammenden *I. ricinus* Zecken konnte eine Infektion mit Rickettsien nachgewiesen werden. Insgesamt waren 3 % (5/166) der Kleinsäuger mit Rickettsien befallen – vier Gelbhalsmäuse (4,3 %) und eine Rötelmaus (1,4 %). Alle fünf infizierten Zecken waren Larven, wobei bei den vier von Gelbhalsmäusen stammenden Amplifikaten drei als *R. helvetica* und eine als *Rickettsia* spp. klassifiziert werden konnten. Eine infizierte Larve wurde einer Rötelmaus entnommen und per Sequenzierung als *R. helvetica* identifiziert. Eine Rötelmaus war neben *B. microti* auch mit einer *R. helvetica* tragenden Larve befallen. Im Sommer konnten keine Infektionen mit Rickettsien nachgewiesen werden. Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Rickettsienbefall zwischen den unterschiedlichen Fangperioden ($p=0,341$). In Tab. 23 werden die Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in Zecken von Kleinsäufern aus Reifenstein veranschaulicht.

Tab. 23 Prävalenz von *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* von Kleinsäufern aus Reifenstein. La-Larve, neg-negativ, MF-Frühling, MH-Herbst, *R.-Rickettsia*, *helv.-helvetica*, spp.-species pluralis, *B. micr.-Babesia microti*. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet den Kleinsäuger, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zeckenzahl.

Zecke	Kleinsäugerart	Stadium	Erreger	weitere Zecken
MF18b	Rötelmaus	La	<i>R. helv.</i>	1 La (<i>B. micr.</i>)
MF24	Gelbhalsmaus	La	<i>Rickettsia</i> spp.	0
MF27c	Gelbhalsmaus	La	<i>R. helv.</i>	3 La (neg.)
MF30a	Gelbhalsmaus	La	<i>R. helv.</i>	1 La (neg.)
MH16	Gelbhalsmaus	La	<i>R. helv.</i>	0

5.5.4 Infektionen mit Babesien

Die Prävalenz von Babesien in Zecken von Kleinsäufern lag bei 6,6 % (18/273). Der Unterschied zwischen Babesieninfektionen in Zecken von Rötelmäusen (8,4 %) und Gelbhalsmäusen (5,4 %) war nicht signifikant ($p>0,05$). Insgesamt fanden sich an 10,2 % (17/166) der untersuchten Kleinsäuger infizierte *I. ricinus* Zecken. Auch hier erwies sich der Unterschied in der Anzahl infizierter Individuen beider Arten als nicht signifikant ($p>0,05$). Bei den von Gelbhalsmäusen stammenden Zecken traten neun Infektionen mit Babesien auf,

vier davon wurden durch *B. microti* verursacht und fünf durch *B. divergens*, wobei eine Koinfektion von *B. divergens* mit *A. phagocytophilum* in einer Larve detektiert werden konnte. Bei den von Rötelmäusen stammenden Zecken ergaben sich neun Infektionen, davon sechs mit *B. microti*, zwei mit *B. divergens* und eine durch *Babesia* spp. Die Unterschiede zwischen beiden Arten im Befall mit den einzelnen Spezies ergaben keine Signifikanz ($p > 0,05$).

Der Anteil infizierter Nymphen war mit 30,8 % (4/13) signifikant höher als der der Larven mit 5,4 % (14/258) ($p = 0,007$). Es waren signifikant mehr Nymphen (23,1 %) als Larven (2,7 %) mit *B. microti* befallen ($p = 0,009$). Alle *B. divergens* Infektionen sowie sieben von zehn mit *B. microti* fanden sich in Larven. Dabei besaß eine Gelbhalsmaus zwei *B. divergens* tragende Larven. Eine Rötelmaus trug neben *B. microti*-positiven Larven auch eine *R. helvetica*-infizierte Larve. Die Babesienprävalenz in Kleinsäugern entnommenen Zecken war im Frühling mit 3,4 % signifikant geringer als in vom Sommer stammenden Zecken mit 10,1 % ($p = 0,048$). Im Herbst lag sie bei 10,3 %. Betrachtet man dies im Befall mit den unterschiedlichen Babesienspezies ergab sich lediglich bei Infektionen mit *B. divergens* ein signifikanter Unterschied zwischen aus dem Frühling (0,7 %) und dem Sommer (6,7 %) stammenden infizierten *I. ricinus* ($p = 0,013$). Die Tab. 24 zeigt das Vorkommen von *Babesia* spp. in *I. ricinus* von Kleinsäugern.

Tab. 24 Prävalenz von *Babesia* spp. in Zecken von Kleinsäugetern im Untersuchungsgebiet Reifenstein. Koinf.-Koinfektion, La-Larve, Ny-Nymphe, neg-negativ, MF-Frühling, MS-Sommer, MH-Herbst, *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, *B.*-*Babesia*, *R.*-*Rickettsia*, *div.*-*divergens*, *micr.*-*microti*, *helv.*-*helvetica*, spp.-species pluralis, Prozentangaben in Klammern. Die Nummer im Zecken-namen bezeichnet den Kleinsäuger, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zecken-zahl.

Zecke	Kleinsäugerart	Stadium	Erreger	Koinf.	weitere Zecken
MF6	Rötelmaus	Ny	<i>B. micr.</i>		0
MF18a	Rötelmaus	La	<i>B. micr.</i>		1 La (<i>R. helv.</i>)
MF19	Rötelmaus	Ny	<i>B. micr.</i>		0
MF59a	Gelbhalsmaus	La	<i>B. div.</i>		2 La (neg.)
MF102b	Gelbhalsmaus	Ny	<i>B. micr.</i>		1 La (neg.)
MS28c	Rötelmaus	La	<i>B. div.</i>		2 La (neg.)
MS29b	Rötelmaus	La	<i>B. div.</i>		1 La (neg.)
MS35	Gelbhalsmaus	La	<i>B. div.</i>	<i>A. phag.</i>	0
MS38	Gelbhalsmaus	La	<i>B. micr.</i>		0
MS43	Rötelmaus	La	<i>B. micr.</i>		0
MS44	Rötelmaus	Ny	<i>Babesia</i> spp.		0
MS48	Gelbhalsmaus	La	<i>B. div.</i>		0
MS64c	Gelbhalsmaus	La	<i>B. div.</i>		2 La (neg.)
MS64e		La	<i>B. div.</i>		1 Ny (neg.)
MH27	Rötelmaus	La	<i>B. micr.</i>		0
MH31a	Rötelmaus	La	<i>B. micr.</i>		1 La (neg.)
MH37	Gelbhalsmaus	La	<i>B. micr.</i>		0
MH39	Gelbhalsmaus	La	<i>B. micr.</i>		0
Gesamt	9 Rötelmäuse(12,3)	14 La (5,4)	10 <i>B. micr.</i>		
	8 Gelbhalsmäuse (8,6)	4 Ny (30,8)	7 <i>B. div.</i>		
			1 <i>Babesia</i> spp.		

5.6 Wirtssuchende *I. ricinus*

Zwischen Mai und Oktober 2007 wurden 196 auf Wirtssuche befindliche Zecken in Reifenstein im Freiland gesammelt (162 Nymphen, 34 Adulte). Larven wurden im Freiland nicht gesammelt.

5.6.1 Infektionen mit Anaplasmen

Bei den 196 aus dem Freiland stammenden *I. ricinus* Zecken konnte keine Infektion mit Anaplasmen nachgewiesen werden.

5.6.2 Infektionen mit Rickettsien

Infektionen mit Rickettsien wurden bei 4,1 % (8/196) der im Freiland gesammelten Zecken detektiert. Dabei entfielen sieben Infektionen auf Nymphen (4,3 %) und eine auf ein Männchen (2,9 %). Bei einer Nymphe trat eine Koinfektion von *Rickettsia* spp. mit *B. divergens* auf. Zwei positive Zecken stammten vom Frühling, sechs Infektionen traten bei im Herbst gesammelten *I. ricinus* auf. Bei im Sommer gesammelten Zecken konnten keine Rickettsien nachgewiesen werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Befall der wirtssuchenden Zecken mit Rickettsien in den unterschiedlichen Fangperioden ($p=0,751$). Die Sequenzanalyse ergab zwei Infektionen mit *R. helvetica*, in sechs Fällen konnte lediglich *Rickettsia* spp. identifiziert werden (s. Kap. 6.6., S. 94).

5.6.3 Infektionen mit Babesien

Babesien-spezifische DNA wurde in 10,7 % (21/196) der wirtssuchenden Zecken gefunden. Dabei waren 20 Nymphen (12,3 %) und eine adulte Zecke (2,9 %) infiziert. Eine Nymphe war sowohl mit *B. divergens* als auch mit *Rickettsia* spp. infiziert. Neun Infektionen wurden bei im Frühling gesammelten Zecken, zwölf bei vom Herbst stammenden *I. ricinus* nachgewiesen. Wirtssuchende Zecken aus dem Sommer waren nicht mit Babesien infiziert. Die Prävalenzen von Babesien in Zecken aus dem Freiland waren im Frühling mit 25 % signifikant höher als im Herbst mit 7,9 % ($p=0,007$). Dieser Unterschied fand sich auch im Befall mit *B. microti*, der im Frühling mit 16,7 % deutlich höher war als im Herbst mit 3,3 % ($p=0,007$). Die Speziesdifferenzierung ergab bei zehn Proben *B. divergens* (5,1 %) und in elf Proben *B. microti* (5,6 %).

5.7 Koinfektionen

Mehrfachinfektionen von *I. ricinus* traten in unterschiedlichen Kombinationen auf.

5.7.1 Koinfektionen mit *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp.

Koinfektionen mit mehr als einem Erreger wurden bei 0,6 % (4/658) der untersuchten *I. ricinus* nachgewiesen, wobei in allen vier Fällen *B. divergens* einen der beiden Erreger darstellte. Die Tab. 25 gibt einen Überblick über die aufgetretenen Mehrfachinfektionen in den untersuchten Zecken aus Reifenstein.

Tab. 25 Koinfektionen in *I. ricinus* unterschiedlichen Ursprungs aus Reifenstein. Infest.-Infestation, Inf.-Infektionen, ges.-gesamt, La-Larve, Ny-Nymphe, VF-Vogel, Frühling, MS-Maus, Sommer, FF-Freiland, Frühling, *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, *B.-Babesia*, *R.-Rickettsia*, *div.-divergens*, *micr.-microti*, *helv.-helvetica*, *mon.-monacensis*, spp.-species pluralis. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet das Wirtstier, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zeckenzahl.

Ursprung	Zecke	Stadium	Erreger		Infest. ges. weitere Inf. Wirt	
Amsel	VF1h	La	<i>A. phag.</i>	<i>B. div.</i>	11 La, 9 Ny	4 Ny (2 <i>R. mon.</i> , 1 <i>R. helv.</i> , 1 <i>A. phag.</i>)
Amsel	VF25c	Ny	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>B. div.</i>	1 La, 3 Ny	1 La (<i>B. micr.</i>)
Gelbhalsmaus	MS35	La	<i>A. phag.</i>	<i>B. div.</i>	1 La	0
Freiland	FF27	Ny	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>B. div.</i>		0

5.7.2 Koinfektionen mit *Borrelia* spp. und *Francisella tularensis*

Neben *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. wurden dieselben *I. ricinus* des Thüringer Habitates in zwei weiteren Arbeitsgruppen auch auf verschiedene Borreliengenospezies sowie auf *F. tularensis* untersucht (Franke 2010, Franke et al. 2010). Die Tab. 26 zeigt die sich aus diesen Untersuchungen ergebenden Koinfektionen borrelieninfizierter *I. ricinus* mit „emerging pathogens“. Mit *F. tularensis* infizierte *I. ricinus* wiesen keine Koinfektionen mit anderen der untersuchten Erreger auf (Franke et al. 2010).

Tab. 26 Koinfektionen borrelieninfizierter *I. ricinus* unterschiedlichen Ursprungs aus Reifenstein. La-Larve, Ny-Nymphe, VF-Frühling, VS und MS-Sommer, VH und FH-Herbst, *Bo.-Borrelia*, *bav.-bavariensis*, *gar.5-8-garinii* (OspA Typen 5 bis 8), *val.I-valaisiana* (Subtyp I), *bur.-burgdorferi*, *B. div.-Babesia divergens*, *R. mon.-Rickettsia monacensis*, spp.-species pluralis. Die Nummer im Zeckennamen bezeichnet das Wirtstier, von dem sie abgesammelt wurde, der Kleinbuchstabe die Zeckenzahl.

Ursprung	Zecke	Stadium	Borrelien	Babesien	Rickettsien
Amsel	VF1i	Ny	<i>Bo. bav.</i>		<i>R. mon.</i>
Amsel	VF24b	Ny	<i>Bo. gar. 5 + Bo. gar. 6</i>		
Amsel	VF27b	Ny	<i>Bo. val. I + Bo. gar. 6</i>		
Amsel	VS40a	La	<i>Bo. val. I + Bo. gar. 6 + Bo. gar. 8</i>		
Amsel	VS40b	La	<i>Bo. val. I + Bo. gar. 8</i>		
Amsel	VH95c	La	<i>Bo. bur.</i>	<i>B. div.</i>	
Amsel	VH95d	La	<i>Bo. gar. 6</i>	<i>B. div.</i>	
Amsel	VH95f	La	<i>Bo. gar. 6</i>	<i>B. div.</i>	
Rötelmaus	MS44	Ny	<i>Bo. bur.</i>	<i>Babesia spp.</i>	
Freiland	FH87	Ny	<i>Bo. val. I</i>		<i>Rickettsia spp.</i>
Freiland	FH134	Ny	<i>Bo. bur.</i>	<i>B. div.</i>	

Unter Berücksichtigung dieser Daten ergaben sich bei 16,7 % (15/90) aller positiven *I. ricinus* Infektionen mit mindestens zwei Pathogenen. Dabei traten bei einem Drittel die Kombination Borrelien und *Babesia* spp. und in jeweils zwei *I. ricinus* Infektionen von Borrelien und *Rickettsia* spp., *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. sowie *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* auf. Bei vier Zecken ergaben sich Kombinationen verschiedener Borreliengenspezies (Franke et al. 2010). Am häufigsten waren Koinfektionen bei von Vögeln stammenden infizierten Zecken (27 %, 10/37) zu beobachten. Bei kleinsäugerassoziierten positiv getesteten *I. ricinus* ergaben sich Mehrfachinfektionen bei 8 % (2/25), bei wirtssuchenden *I. ricinus* zu 10,7 % (3/28).

Neben den aufgetretenen Koinfektionen war häufig festzustellen, dass ein Wirt mehr als eine infizierte Zecke trug. Bei Kleinsäugetieren lag der Anteil unter Berücksichtigung der Borrelieninfektionen bei 2,4 % (4/166) der untersuchten Tiere. Bei Vögeln konnten bei insgesamt 17,9 % (10/56) der Individuen Zecken mit Pathogenen anderer Gattungen und Spezies oder mehrere Zecken mit dem jeweils gleichen Erreger nachgewiesen werden. Dabei war eine Amsel (VF1h) mit Zecken infestiert, die insgesamt mit sechs verschiedenen Spezies infiziert waren. Eine Übersicht dazu gibt Tab. 27.

Tab. 27 Wirtstiere mit Infestation mit von mehreren Pathogenen befallenen Zecken. Die Koinfektionen unter Beteiligung von *Borrelia* spp. ermittelte Herr Franke (Franke 2010). Jedes Farbsymbol steht für eine mit dem jeweiligen Erreger infizierte Zecke. Gleiche Farbsymbole in einer Zeile symbolisieren eine koinfizierte Zecke desselben Wirtstieres. Inf.-Infektion, Infest.-Infestation, La-Larve, Ny-Nympe, ges.-gesamt, *A.-Anaplasma*, *R.-Rickettsia*, *B.-Babesia*, *Bo.-Borrelia*, *helv.-helvetica*, *mon.-monacensis*, *div.-divergens*, *micr.-microti*, *bav.-bavariensis*, *bur.-burgdorferi*, *gar.-garinii*, *val.-valaisiana*, spp.-species pluralis, VF und MF-Frühling, VS und MS-Sommer, VH-Herbst. Die Zahl in der Zeckenbezeichnung ist die Nummer des Wirtstieres, von dem sie abgesammelt wurde. * Koinfektion von *Bo. garinii* OspA Typ 5 und 6, ° Koinfektion von *Bo. garinii* OspA Typ 6 und 8.

Zecke	Wirt	Zahl Inf./ Zahl Infest.		Erreger											
		La	Ny	<i>A.</i>	<i>R.</i> <i>helv.</i>	<i>mon.</i>	<i>spp.</i>	<i>B. div.</i>	<i>micr</i>	<i>spp.</i>	<i>Bo. bav.</i>	<i>bur.</i>	<i>gar.</i>	<i>val.</i>	
VF1	Amsel	1(11)	5(9)												
VF11	Amsel	3(5)	1(5)												
VF24	Amsel	0(0)	1(3)												
VF25	Amsel	1(1)	1(3)												
VF27	Amsel	0(0)	1(5)												
VS40	Amsel	2(2)	0(0)												
VS72	Amsel	1(1)	1(6)												
VH95	Amsel	3(5)	0(1)												
VH80	Rotkehlchen	0(0)	2(3)												
VF13	?	0(0)	2(2)												
Gesamt Vogel 17,9% (10/56)		11(25)	14(37)	4	1	2	1	10	4	1	1	8		4	
MF18	Rötelmaus	2(13)	0(0)												
MS44	Rötelmaus	0(0)	1(1)												
MS64	Gelbhalsmaus	2(5)	0(1)												
MS35	Gelbhalsmaus	1(1)	0(0)												
Gesamt Maus 2,4% (4/166)		5(19)	1(2)	1	1			3	1	1		1			

5.8 Prävalenzvergleich

Im Folgenden werden die Prävalenzen der untersuchten Erreger in *I. ricinus* Zecken von unterschiedlichen Wirtstieren bzw. aus dem Freiland gegenübergestellt und miteinander verglichen.

5.8.1 Erreger

Bei insgesamt 1,4 % (9/658) der untersuchten Zecken traten Infektionen mit *A. phagocytophilum* auf. Dabei war die Prävalenz in von Vögeln stammenden Zecken mit 3,2 % (6/189) signifikant höher als die bei wirtssuchenden Zecken (0 %, 0/196; $p=0,013$) wie Abb. 25 veranschaulicht. Zecken von Kleinsäugetieren waren zu 1,1 % (3/273) mit Anaplasmen befallen. Die Differenzen zwischen vogel- und mäuseassoziierten Zecken in den Infektionsraten bei Larven (3,2 % und 1,2 %) und Nymphen (3,2 % und 0 %) ließen sich statistisch nicht belegen. Innerhalb der Zecken von Vögeln war das Verhältnis zwischen infizierten Larven und Nymphen ausgeglichen (3,2 %, 2/63 bzw. 13/126) währenddessen bei Mäusen ausschließlich *I. ricinus* Larven mit Anaplasmen befallen waren.

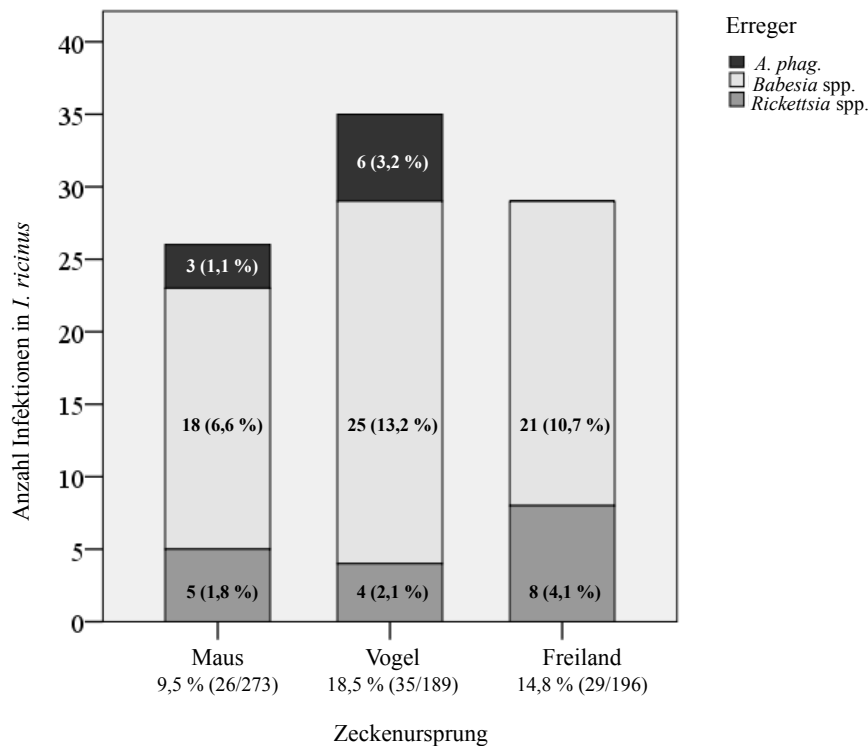


Abb. 25 Prävalenzen der untersuchten Erreger in *I. ricinus* Zecken unterschiedlichen Ursprungs. Es sind nur die infizierten Zecken abgebildet. Anaplasmen und Babesien fanden sich am häufigsten in vogelassoziierten Zecken währenddessen für Rickettsien die höchsten Prävalenzen in wirtssuchenden *I. ricinus* ermittelt wurden. *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, spp.-species pluralis.

Rickettsia spp. konnte bei insgesamt 2,6 % (17/658) der untersuchten Zecken nachgewiesen werden. Dabei zeigten im Freiland gesammelte *I. ricinus* mit 4,1 % (8/196) deutlich höhere Prävalenzraten für Rickettsien als in Zecken von Vögeln (2,1 %, 4/189) oder Mäusen (1,8 %, 5/273) detektiert wurden wie Abb. 25 verdeutlicht. In den verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt sich dieser Unterschied auch bei der Betrachtung der Nymphen, wobei die aus dem Freiland stammenden mit 4,3 % (7/162) häufiger befallen waren als solche von Vögeln (3,2 %, 4/126) oder Mäusen (0 %, 0/13). Diese Unterschiede sind allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,854$). Die von Vögeln stammenden mit Rickettsien infizierten Zecken waren alle Nymphen (3,2 %) wohingegen sich der Erreger bei von Kleinsäugetieren stammenden *I. ricinus* ausschließlich in Larven fand (1,9 %). Der Vergleich der Rickettsienspezies ergab für *R. helvetica* und *R. monacensis* weder zwischen den verschiedenen Wirten bzw. Zecken aus dem Freiland noch stadienabhängig signifikante Unterschiede in den Prävalenzraten ($p>0,05$). Lediglich bei *Rickettsia* spp. waren signifikant mehr wirtssuchende Zecken (3,1 %, 6/196) als solche von Mäusen (0,4 %, 1/273) befallen ($p=0,023$).

Die Gesamtprävalenz von Babesien in den untersuchten *I. ricinus* Zecken lag bei 9,7 % (64/658). Dabei wiesen signifikant mehr von Vögeln stammende Zecken (13,2 %, 25/189) Infektionen mit Babesien auf als solche von Kleinsäugetieren (6,6 %, 18/273; $p=0,022$). In wirtssuchenden Zecken lag die Prävalenz bei 10,7 % (21/196) (s. Abb. 25, S. 68). Innerhalb der von Vögeln und aus dem Freiland stammenden Zecken wurden keine deutlichen Unterschiede im Babesienbefall zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien nachgewiesen ($p>0,05$). Bei von Kleinsäugetieren stammenden Zecken zeigt sich jedoch, dass Nymphen (30,8 %, 4/13) signifikant häufiger mit Babesien infiziert waren als Larven (5,4 %, 14/258; $p=0,007$). Unterschiede traten auch beim Vergleich der Prävalenzen für die einzelnen Spezies auf. Für *B. divergens* ergaben sich die höchsten Prävalenzen mit 8,5 % (16/189) in von Vögeln stammenden Zecken, signifikant geringer waren die Infektionen in von Kleinsäugetieren stammenden Zecken (2,6 %, 7/273; $p=0,008$) bzw. in Zecken aus dem Freiland (5,1 %, 10/196). Dieser Unterschied ist auch statistisch signifikant bei ausschließlicher Betrachtung des Befalls der Larven, wobei Larven von Vögeln mit 12,7 % (8/63) deutlich häufiger mit *B. divergens* befallen waren als solche von Mäusen (2,7 %, 7/258; $p=0,003$). Bei Nymphen und Adulten zeigen sich diese Unterschiede nicht. *Babesia microti* war hingegen signifikant häufiger in Nymphen von Kleinsäugetieren (23,1 %, 3/13) als in Nymphen von Vögeln (3,2 %, 4/126) zu finden ($p=0,018$). Außerdem zeigten sich auch innerhalb der von Kleinsäugetieren stammenden Zecken signifikant mehr Infektionen mit *B. microti* bei Nymphen (23,1 %, 3/13) im Vergleich zu Larven (2,7 %, 7/258; $p=0,009$).

Betrachtet man nur die von den verschiedenen Wirtstieren stammenden Larven bezüglich der Infektion mit *Babesia* spp. ergibt sich auch dort ein deutlicher Unterschied zwischen infizierten vogel- (19 %, 12/63) und mäuseassoziierten Larven (5,4 %, 14/258; $p=0,001$). Bei Nymphen zeigte sich ein umgekehrtes Bild mit höheren Infektionsraten bei Kleinsäugetieren (30,8 %, 4/13) verglichen mit Vögeln (10,3 %, 13/126) und Zecken aus dem Freiland (12,3 %, 20/162) wie Abb. 26 verdeutlicht.

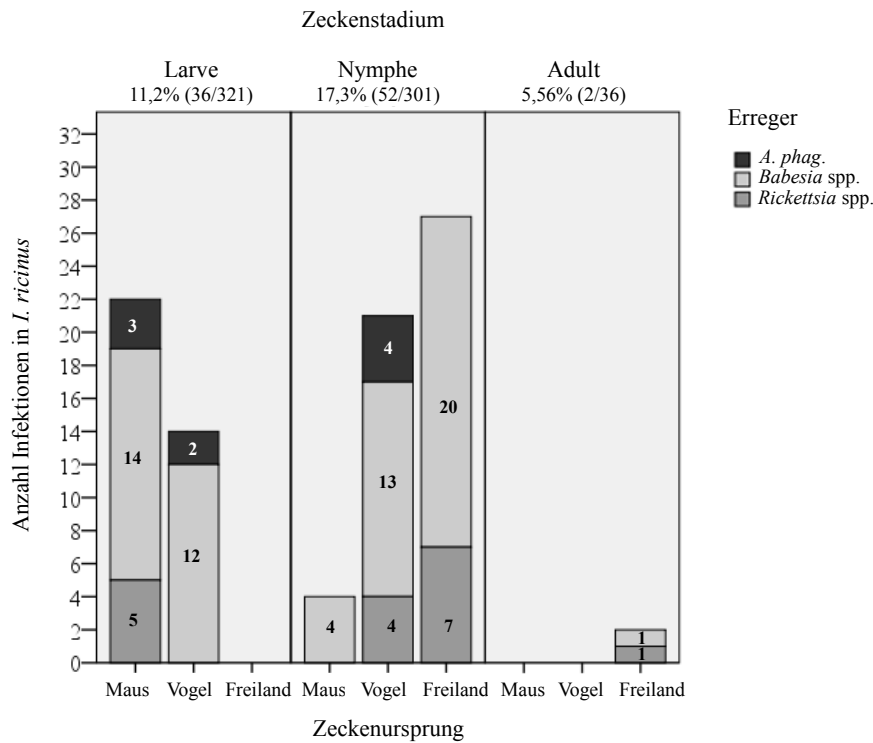


Abb. 26 Anteil detektierter Infektionen in *I. ricinus* in Abhängigkeit des Zeckenursprungs- und des stadiums. Deutlich wird die stärkere Infestation von Mäusen mit Larven währenddessen bei Vögeln die Infestation mit Nymphen überwiegt. Ursache ist das Vorkommen der verschiedenen *I. ricinus* Stadien in unterschiedlich hohen Vegetationsschichten, das seine Entsprechung im Befall mit verschieden großen Wirtstieren findet. Im Freiland wurden häufiger Nymphen gesammelt als andere Entwicklungsstadien. *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, spp.- species pluralis.

Die Prävalenzen der drei untersuchten Erreger unterschieden sich auch saisonal in Abhängigkeit der Jahreszeit, in der die Zecken von den Wirtstieren bzw. aus dem Freiland gesammelt wurden wie Abb. 27 im Überblick darstellt.

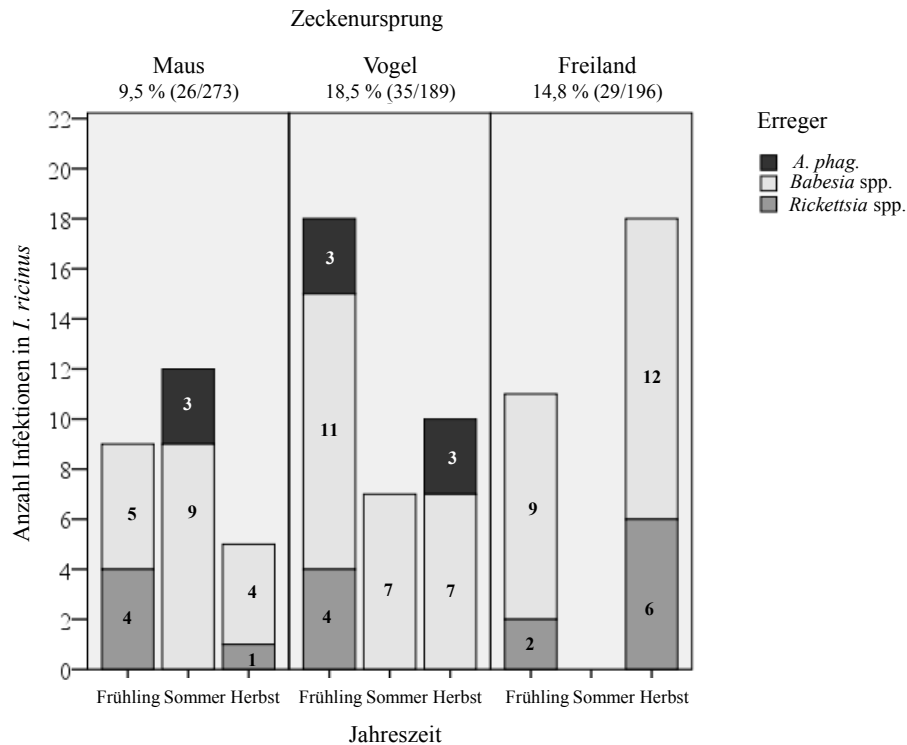


Abb. 27 Anteil detektierter Infektionen in *I. ricinus* in Abhängigkeit des Zeckenursprungs und der Jahreszeit. In wirtssuchenden Zecken wurden keine Anaplasmeninfektionen nachgewiesen, ebenso wenig wiesen im Sommer im Freiland gesammelte *I. ricinus* Erreger auf. *A. phag.*-*Anaplasma phagocytophilum*, spp.-species pluralis, Frühling (01.05.-19.06.2007), Sommer (09.07.-16.08.2007), Herbst (26.08.-14.10.2007).

Der Vergleich der Infektionsraten zwischen den einzelnen Jahreszeiten mit allen drei untersuchten Pathogenen unabhängig vom Ursprung der Zecken ergab insgesamt keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Bei einzelner Betrachtung der von Vögeln stammenden *I. ricinus* zeigte sich jedoch ein Unterschied mit Signifikanz in der Zahl der aufgetretenen Infektionen zwischen im Sommer (10,8 %) und im Herbst (30,3 %) gesammelten Zecken ($p = 0,023$). Die Abb. 28 zeigt die zu unterschiedlichen Fangperioden aufgetretenen Infektionen in *I. ricinus* von Vögeln.

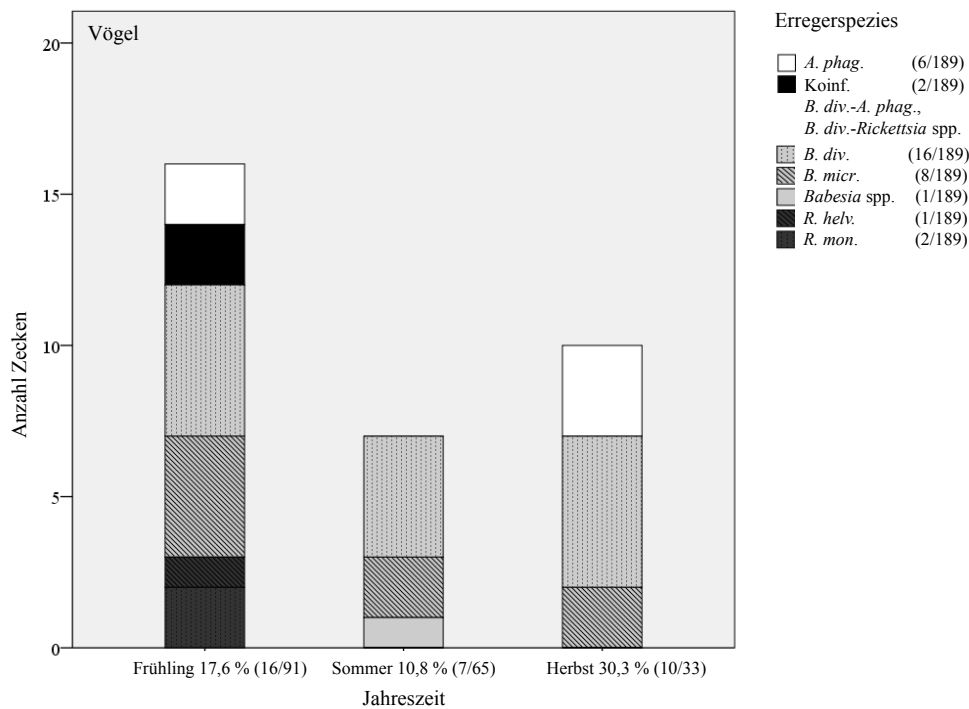


Abb. 28 Prävalenzen der untersuchten Erregerspezies in von Vögeln stammenden *I. ricinus* aus Reifenstein in den drei unterschiedlichen Fangperioden. Die Angaben in der Legende geben die Gesamtzahl der aufgetretenen Infektionen einschließlich der Koinfektionen in von Vögeln stammenden Zecken wieder (35 Infektionen in 33 *I. ricinus* Zecken). Koinf.-Koinfektion, *A. phag.*-*A. phagocytophilum*, *B.-Babesia*, *R.-Rickettsia*, *div.-divergens*, *micr.-microti*, *helv.-helvetica*, *mon.-monacensis*, spp.-species pluralis, Frühling (01.05.-19.06.2007), Sommer (09.07.-16.08.2007), Herbst (26.08.-14.10.2007).

In wirtssuchenden Zecken aus dem Freiland konnte bei vom Frühling stammenden mit 27,8 % (10/36) eine deutlich höhere Infektionsrate nachgewiesen werden als bei solchen aus dem Herbst (11,8 %, 18/152; $p=0,034$). Die Abb. 29 verdeutlicht dies unter Berücksichtigung der einzelnen detektierten Spezies.

Von Kleinsäugetieren stammende *I. ricinus* wiesen keine signifikanten Unterschiede in den Infektionszahlen mit den drei untersuchten Erregern zu verschiedenen Fangperioden auf. Die Verteilung der in Zecken von Kleinsäugetieren detektierten Pathogenspezies zu verschiedenen Jahreszeiten stellt Abb. 30 dar.

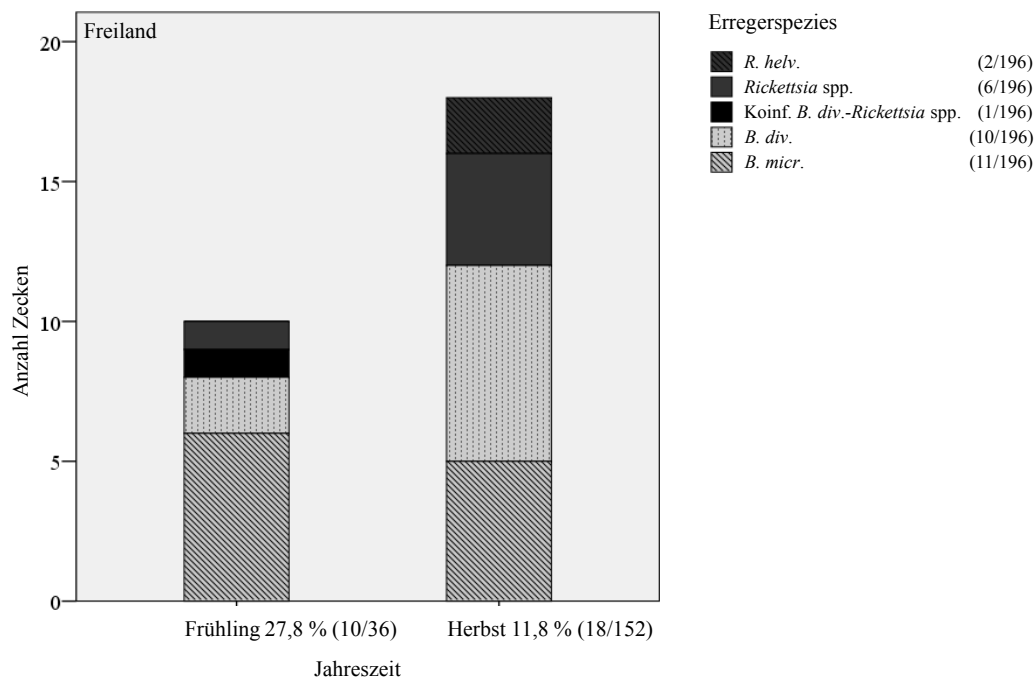


Abb. 29 Prävalenzen der untersuchten Erregerspezies in wirtssuchenden Zecken aus Reifenstein zu unterschiedlichen Fangperioden. Bei im Sommer gesammelten wirtssuchenden Zecken wurden keine Infektionen detektiert. Es traten auch keine Anaplasmeninfektionen in Zecken aus dem Freiland auf. Die Angaben in Klammern der Legende geben die Gesamtwerte der aufgetretenen Infektionen einschließlich der Koinfektionen von aus dem Freiland stammenden Zecken wieder (29 Infektionen in 28 *I. ricinus* Zecken). Koinf.-Koinfektion, *B.*-*Babesia*, *div.*-*divergens*, *micr.*-*microti*, *R. helv.*-*Rickettsia helvetica*, spp.-species pluralis, Frühling (01.05.-19.06.2007), Herbst (26.08.-14.10.2007).

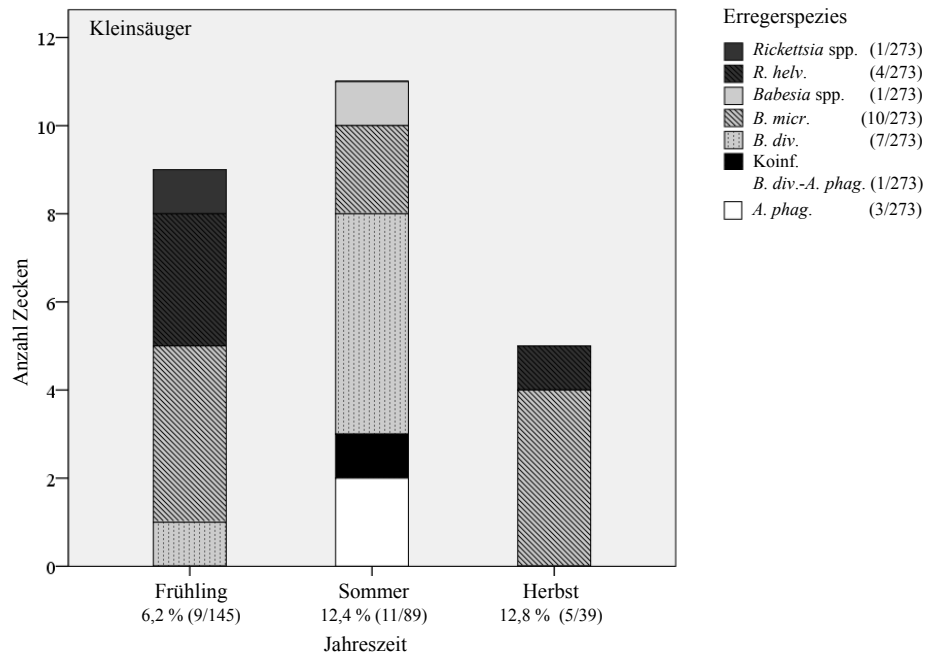


Abb. 30 Prävalenzen der drei untersuchten Erregerspezies in von Kleinsäufern stammenden *I. ricinus* Zecken aus Reifenstein in den drei verschiedenen Fangperioden. Die Angaben in der Legende geben die Gesamtzahl der Infektionen einschließlich der Koinfektionen in Zecken von Kleinsäufern wieder (26 Infektionen in 25 *I. ricinus* Zecken). Koinf.-Koinfektion, *A. phag.*-*A. phagocytophilum*, *B.-Babesia*, *div.-divergens*, *micr.-microti*, *R. helv.-R. helvetica*, spp.-species pluralis, Frühling (01.05.-19.06.2007), Sommer (09.07.-16.08.2007), Herbst (26.08.-14.10.2007).

5.8.2 Wirte

Vergleicht man das Vorkommen von Anaplasmen, Rickettsien und Babesien in Bezug auf die Anzahl der mit positiven Zecken befallenen Wirtstiere ergeben sich für Anaplasmen und Rickettsien keine signifikanten Unterschiede zwischen Vögeln und Kleinsäufern ($p>0,05$). Während 7,1 % (4/56) aller Vögel Anaplasmen positive Zecken trugen, waren es nur 1,8 % (3/166) aller Mäuse. Bei mit Rickettsien infizierten Zecken ist das Verhältnis ausgeglichener. So waren 3,6 % (2/56) aller Vögel und 3 % (5/166) aller untersuchten Kleinsäuger mit mindestens einer Rickettsien positiven Zecke befallen. Für das Vorkommen Babesien tragender *I. ricinus* bei den beiden Wirtstiergruppen ergaben sich deutliche Unterschiede. So waren signifikant mehr Vögel (30,4 %, 17/56) mit Babesien infizierten Zecken befallen als Kleinsäuger (10,2 %, 17/166; $p=0,001$). Auch bei Betrachtung der einzelnen Spezies ergab sich ein signifikant häufigeres Vorkommen von *B. divergens* bei Vögeln (21,4 %, 12/56) als bei Mäusen (3,6 %, 6/166; $p<0,001$). Zwischen den beiden untersuchten Kleinsäugerspezies zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Infektionszahlen mit den drei Pathogenen.

Von allen entnommenen Larven waren die von Vögeln stammenden (20,6 %, 13/63) signifikant häufiger als solche von Kleinsäugetieren (8,1 %, 21/258) infiziert ($p=0,010$). Betrachtet man die involvierten Erregerspezies zeigt sich dieser Unterschied ausschließlich beim Befall von mit Babesien infizierten Larven, die bei Zecken von Vögeln zu 19 % (12/63) und in solchen von Kleinsäugetieren nur zu 5,4 % (14/258) vorkamen ($p=0,001$).

6. Diskussion

6.1 Der Vektor *Ixodes ricinus*

6.1.1 Fangdaten und Infestationszahlen

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Vogelspezies sind der am Boden lebenden Ordnung *Passeriformes* angehörig. Vogelarten, die am Boden auf Nahrungssuche gehen, sind aufgrund des höheren Expositionsrisikos gegenüber Zecken häufiger infestiert und infiziert. Sie tragen somit zur Aufrechterhaltung und Verbreitung von zeckenassoziierten Pathogenen bei (Ogden et al. 2008, Elfving et al. 2010). So ermittelten Elfving et al. in Schweden viermal höhere Infektionszahlen in Zecken von am Boden Futter suchenden Zugvogelarten (Elfving et al. 2010). Dagegen konnten in Deutschland in einer Thüringer Studie nur geringe Infestationszahlen von Heckenbraunelle und Zilpzalp nachgewiesen werden, obgleich auch diese Arten am Boden Nahrung suchen (Kipp 2008).

Die Fangzahlen der einzelnen Arten in der vorliegenden Arbeit waren sehr heterogen. Am häufigsten waren Amsel, Rotkehlchen und Singdrossel vertreten, in Deutschland häufig vorkommende Vogelarten. Einige Spezies wie Zilpzalp, Heckenbraunelle oder Kohlmeise wurden, obgleich sie zu den 20 häufigsten Brutvogelarten in Deutschland zählen (Sudfeldt et al. 2008), nur in äußerst geringer Individuenzahl gefangen. Betrachtet man die Infestation der untersuchten Vogelspezies, zeigten vor allem Vögel der Gattung *Turdus* die höchsten Befallszahlen. Bei Vogelstudien in Italien war ebenfalls die Amsel (*Turdus merula*) die am stärksten infestiert Art, in Russland, Spanien, Norwegen und Polen genauso Vertreter von *Turdus* spp. (Alekseev et al. 2001, Mannelli et al. 2005, Estrada-Peña et al. 2005, Skotarczak et al. 2006, Paulauskas et al. 2009). Spitalská et al. konnten bei Amsel, Singdrossel und Heckenbraunelle die meisten Zecken nachweisen (Spitalská et al. 2006). Eine Studie in Thüringen, die das Habitat in Reifenstein einschloss, fand bei Amseln und Singdrosseln im Vergleich mit anderen Vogelarten die höchsten Infestationszahlen (Kipp 2008). Im Durchschnitt lag diese bei Amseln bei vier Zecken pro Vogel, was mit dem Wert der vorliegenden Arbeit korreliert (\bar{O} 4,2), wenngleich der Wert von 2,5 bei Singdrosseln erheblich niedriger liegt als der der vorliegenden Untersuchung (\bar{O} 6,8) (Kipp 2008). In derselben Arbeit wurden bei Heckenbraunellen (*Prunella modularis*) überwiegend tote *I. ricinus* abgesammelt, was auf eine Immunreaktion der Tiere gegen die Parasiten zurückzuführen sein könnte wie sie auch bei Kleinsäugetern beobachtet wurde (Dizij und Kurtenbach 1995, Humair et al. 1999). Betrachtet man die Infestation von Vögeln mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *I. ricinus*

weisen zahlreiche Studien einen deutlich stärkeren Befall mit Nymphen als mit Larven nach (Bjoersdorff et al. 2001, Scotarczak et al. 2006, Stern et al. 2006, Kipp 2008, Michalik et al. 2008, Paulauskas et al. 2009, Hildebrandt et al. 2010a). In der vorliegenden Arbeit wurde bei Vögeln ein Infestationsverhältnis von Larven zu Nymphen von 1:2 festgestellt, was sich somit eindeutig mit vorangegangenen Studien deckt. Selten wurden jedoch auch gegenteilige Verhältnisse detektiert (Dubska et al. 2009, Elfving et al. 2010). Am stärksten waren die untersuchten Vögel aus Reifenstein im Frühling (\bar{X} 5,1) infestiert, deutlich weniger Zecken fanden sich im Sommer (\bar{X} 2,8) und Herbst (\bar{X} 2,2). Diese Beobachtung findet sich auch in vorangegangenen Studien in Spanien mit zwei- bis dreifach höheren Infestationszahlen im Frühling als im Sommer, in Russland und auch in einer Thüringer Studie, die weniger Infestationen bei Amsel, Singdrossel und Rotkehlchen im Sommer feststellte (Alekseev et al. 2001, Estrada-Peña et al. 2005, Kipp 2008). Das Absinken der Infestationszahl im Sommer ist vermutlich auf die zumeist höheren Temperaturen und die geringere Luftfeuchtigkeit zurückzuführen (Pretzmann et al. 1964).

Alle untersuchten Kleinsäuger waren Individuen der Gattung *Ap. flavicollis* und *M. glareolus*. Die mittlere Infestation mit *I. ricinus* lag für *Ap. flavicollis* bei 3,8 und für *M. glareolus* bei 3,1 Zecken pro Tier. Die Unterschiede im Zeckenbefall zwischen beiden Kleinsäugerspezies waren nicht signifikant ($p=0,172$). In anderen Studien wurden dagegen höhere Infestationszahlen bei *Ap. flavicollis* ermittelt (Kurtenbach et al. 1995, Siński et al. 2006b, Stańczak et al. 2009). Kipp konnte in Thüringen 2001 und 2002 eine signifikant höhere Infestationszahl von *Ap. flavicollis* gegenüber *M. glareolus* nachweisen, 2004 ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Arten (Kipp 2008). Die mitunter stärkere Infestation bei *Ap. flavicollis* wurde auf eine nur bei *M. glareolus* auftretende Resistenz gegenüber *I. ricinus* Larven erklärt, was zum konsekutiv weniger starken Befall führt (Dizij und Kurtenbach 1995, Lawrie und Nuttall 2001). Auch die Möglichkeit einer Wirtspräferenz von *I. ricinus* wurde in diesem Zusammenhang diskutiert (Nilsson und Lundqvist 1978). Allerdings kann bei Betrachtung der Infestationszahlen zu verschiedenen Fangperioden ein signifikant höherer Zeckenbefall für *Ap. flavicollis* (\bar{X} 6,7) gegenüber *M. glareolus* (\bar{X} 4,1) im Frühling festgestellt werden ($p=0,001$). Dieser Unterschied zeigt sich bei stadienabhängiger Betrachtung nur bei gesogenen Larven, was unter Umständen durch oben genanntes Phänomen zu erklären ist. Dass sich diese Beobachtung im Sommer und Herbst nicht fortsetzt, kann auf die niedrigeren Fangzahlen in diesen Perioden zurückzuführen sein. In einer Studie in Spanien wurde allerdings

auch eine stärkere Infestation bei *M. glareolus* als *Apodemus spp.* nachgewiesen (Estrada-Peña et al. 2005).

Kleinsäuger stellen vor allem für subadulte *I. ricinus* Stadien Wirte dar und sind am häufigsten mit Larven, selten mit Nymphen und Adulten infestiert (Bown et al. 2008). Dies erklärt sich durch ihren überwiegenden Aufenthalt in niedrigen Kraut- und Vegetationsschichten, wo Larven am häufigsten zu finden sind. Für Erreger, die im Entwicklungszyklus von *I. ricinus* nicht transovariell übertragen werden, sind somit geringe Pathogenprävalenzen in den entsprechenden Wirten zu erwarten, da Larven als Überträger nicht in Frage kommen (Liz et al. 2000). In einer Thüringer Studie, die das untersuchte Habitat in Reifenstein mit einschließt, wurden signifikant höhere Infestationszahlen mit Larven als Nymphen bei den Kleinsäufern detektiert (Kipp 2008). Eine weitere deutsche Studie ermittelte zu 97,9 % in von Kleinsäufern stammenden Zecken Larven und lediglich zu 2 % Nymphen (Kurtenbach et al. 1995). Auch Stańczak et al. detektierten in Polen mehr Larven als Nymphen an Kleinsäufern (Stańczak et al. 2009). Die Fangzahlen aus der vorliegenden Studie, in denen der Anteil der Larven 94,5 %, der der Nymphen 4,8 % und von Adulten nur 0,7 % betrug, bestätigen diese Beobachtungen.

Unterschiede in den Infestationszahlen mit verschiedenen Stadien von *I. ricinus* konnten zwischen beiden untersuchten Wirtstierspezies nicht festgestellt werden. Bezüglich der Infestation zu verschiedenen Fangperioden zeigte sich ein deutlicher Höhepunkt im Frühling (\bar{O} 5,3) mit stetigem Abfall über den Sommer (\bar{O} 2,1) zum Herbst hin (\bar{O} 1,9), der auch bei den Vögeln im selben Habitat zu beobachten war und durch eine Thüringer Studie mit denselben Kleinsäugerspezies bestätigt wird (Kipp 2008). Auch Arbeitsgruppen in Spanien und Polen ermittelten die höchsten Infestationszahlen an Kleinsäufern im Frühling (Estrada-Peña et al. 2005, Welc-Falęciak et al. 2008).

Wirtssuchende Zecken wurden in verhältnismäßig geringer Anzahl im untersuchten Habitat gefunden. Dabei sind die Ursachen für die Prävalenz von *I. ricinus* generell sehr vielfältig und werden von einer Reihe an Faktoren bestimmt, die sowohl äußere Einflüsse wie geographische, klimatische und das Habitat betreffende Bedingungen umfassen als auch das Zusammenspiel von geeigneten Wirten, Vektoren und Reservoiren (s. Kap. 2.1.5, S. 8). Kipp ermittelte in einer früheren Untersuchung in Reifenstein eine Dichte von weniger als einer Zecke pro 100 m² (Kipp 2008), was die geringen Fangzahlen erklären könnte. Dennoch bleibt unklar, weshalb im untersuchten Habitat, das geeignete Vegetation und ausreichend Säugetiere

tiere beherbergt, ein solch geringes Vorkommen auftritt (Franke 2010). Der Hauptteil der im Freiland gesammelten Zecken bestand aus Nymphen.

Der Großteil der aus dem Freiland stammenden Zecken wurde im Herbst (77,6 %) gesammelt, deutlich weniger im Frühling (18,4 %) und die wenigsten *I. ricinus* stammten aus dem Sommer (4,1 %). Skotarczak et al. dokumentierten Fangzahlen von 41,1 % im Juni, 9,6 % im September und keiner *I. ricinus* im Juli, was wahrscheinlich auf die hohen Temperaturen und die geringe Feuchtigkeit in diesem Monat zurückzuführen ist (Skotarczak et al. 2006). Dies könnte auch die geringen Fangzahlen im Sommer in der vorliegenden Studie erklären. Eine andere Thüringer Studie berichtet allerdings über vom Frühling zum Sommer relativ konstante Fangzahlen mit einem Höhepunkt im August und September (Hildebrandt et al. 2010b). Abgesehen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit beeinflussen eine Vielzahl weiterer u.a. oben genannter Faktoren die Prävalenz von *I. ricinus*, sodass Varianzen in den Fangzahlen zwischen geographisch verschiedenen Zeckenhabitaten nicht ohne genauere Kenntnisse erklärt werden können (s. Kap. 2.1.5, S. 8).

6.1.2 Bedeutung der „emerging pathogens“ für den Menschen

Im Habitat Reifenstein konnten *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. in *I. ricinus* nachgewiesen werden, was dessen Rolle als Vektor für die untersuchten Pathogene bestätigt. Der Nachweis zum Teil hoher Prävalenzen der genannten Erreger in *I. ricinus* innerhalb Deutschlands korreliert jedoch nicht in jedem Fall mit der Inzidenz entsprechender humaner Infektionen.

Bisher wurden innerhalb Europas ca. 70 HGA Fälle beschrieben (Doudier et al. 2010), jedoch trat keiner innerhalb Deutschlands auf. Seroprävalenzstudien in den USA und Europa deuten darauf hin, dass viele humane Anaplasmeninfektionen klinisch inapparent verlaufen. Dumler et al. ermittelten in einer Metaanalyse Seroprävalenzraten von 3 % in nicht risikoexponierten und 5,3 % in risikoexponierten Bevölkerungsgruppen der USA (Dumler et al. 2005). In Europa liegt die mediane Seroprävalenzrate bei 6,2 % mit Spitzen bis zu 21 % in einigen Studien (Dumler et al. 2005). In Deutschland sind Raten von 1,9 bis 2,6 % in der Normalbevölkerung (Fingerle et al. 1997, Hunfeld und Brade 1999) beschrieben, in Risikokollektiven wie bei Forstarbeitern sogar bis zu 14 % (Fingerle et al. 1997). Aktuelle Daten zur Seroprävalenz von Anaplasmen innerhalb Deutschlands fehlen, doch kann anhand der ermittelten Prävalenzen in *I. ricinus*, die sich in den europäischen Durchschnitt einfügen, auch von ent-

sprechend durchschnittlichen Seroprävalenzraten in der untersuchten Region ausgegangen werden. Ursache für die Diskordanz zwischen Seroprävalenz und klinisch manifesten Infektionen könnten unerkannte Fälle sein oder auf humane Infektionen mit apathogenen *A. phagocytophilum* Strängen zurückzuführen sein (Strle 2004). Auffällig hohe Antikörperprävalenzen von 44,9 % konnten bei Hunden in Deutschland nachgewiesen werden (Jensen et al. 2007), die aufgrund stärkerer Zeckenexposition auch infektionsgefährdeter sind.

Die Seroprävalenzraten für *R. helvetica* in Risikogruppen erreichten 22 % in Schweden (Nilsson et al. 2005), 9,2 % bei Waldarbeitern in Frankreich (Fournier et al. 2000) und 9,1 % in Deutschland (Jansen et al. 2008). Zudem wiesen in Baden-Württemberg 5 % der Patienten mit Fieber nach Zeckenstich einen erhöhten IgM- bzw. IgG-Titer gegen Rickettsien auf (Dobler und Wölfel 2009). In der vorliegenden Studie wurde eine Gesamtprävalenz für *Rickettsia* spp. von 2,6 % ermittelt, was sich mit der Zahl der bisher nur importierten humanen Infektionen in Deutschland deckt. Dies ist sowohl durch den schwierigen Erregernachweis in Zecken als auch beim Menschen bedingt (Dobler und Wölfel 2009).

In Deutschland existiert gegenwärtig nur eine einzige Seroprävalenzstudie, die bei zeckenexponierten Personen in 11,5 % der Fälle Antikörper gegen *B. microti* und *B. divergens* detektierte und bei 1,7 % gesunder Blutspender (Hunfeld et al. 2002). In der Schweiz erreichten die Seroprävalenzraten für *B. microti* 1,5 % (Foppa et al. 2002). Trotz hoher Prävalenzen im Vektor manifestierte sich die humane Babesiose bisher in ca. 47 Fällen innerhalb Europas (Hunfeld et al. 2008, Haaspasalo et al. 2010, Martinot et al. 2011), zweimal davon in Deutschland (Häselbarth et al. 2007, Hildebrandt et al. 2007), sodass auch hier ein Großteil der Infektionen vermutlich klinisch inapparent verläuft oder aufgrund unzureichender diagnostischer Möglichkeiten nicht als solche erkannt werden.

Diese Daten belegen bei Vorhandensein entsprechender Prävalenzen im Vektor *I. ricinus*, wie sie für Thüringen ermittelt werden konnten, auch die Möglichkeit einer humanen Manifestation mit sog. „emerging pathogens“ in der Region.

Vor allem für *B. microti*, vereinzelt auch *B. duncani* besteht zudem das Risiko einer Infektion über Bluttransfusion. Insbesondere in den USA stieg die Zahl der Fälle transfusionsassoziiertter Babesiosen in den letzten Jahren auf ca. 70-100 (Leiby 2011). In Europa existiert gegenwärtig nur ein dokumentierter Fall, bei dem eine Bluttransfusion sehr wahrscheinlich die Quelle der Übertragung von *B. microti* war (Hildebrandt et al. 2007), wobei das Auftreten weiterer, jedoch nicht erfasster Erkrankungen auf diesem Weg durchaus möglich ist. Insbesondere immunsupprimierte oder ältere Patienten sind hierbei gefährdet. Dabei stellen vor

allem asymptomatische Blutspender ein Infektionsrisiko dar, was die Notwendigkeit der Etablierung geeigneter, bisher fehlender Screeningverfahren von Blutprodukten auf Babesien unterstreicht (Leiby 2011).

6.2 *Anaplasma phagocytophilum*

6.2.1 *Anaplasma phagocytophilum* in Zecken von Vögeln

Die mit 3,2 % (6/189) relativ geringe Prävalenz für *A. phagocytophilum* in von Vögeln stammenden Zecken im Untersuchungsgebiet Reifenstein deckt sich weitgehend mit beobachteten Prävalenzraten in anderen europäischen Ländern. Diese reichen von 0 % in Polen (Skotarczak et al. 2006, Skoracki et al. 2006) und Litauen (Paulauskas et al. 2009) bis 5,5 % in Nymphen in Schweden (Bjoersdorff et al. 2001). In Norwegen wurden dagegen in einem von zwei Untersuchungsgebieten sehr hohe Prävalenzraten ermittelt von 14,3 % bzw. 1,9 % in Larven und 10,7 % bzw. 2 % in Nymphen (Paulauskas et al. 2009). In Norddeutschland trugen 2,6% der untersuchten Vögel mit *A. phagocytophilum* infizierte Nymphen (Hildebrandt et al. 2010a).

In der vorliegenden Arbeit waren neben vier Nymphen auch zwei Larven mit *A. phagocytophilum* befallen. Da Anaplasmen nicht transovariell innerhalb einer Zeckenpopulation übertragen werden (Dumler et al. 2001), legt das Vorkommen infizierter Larven nahe, dass die Infektion entweder während des Saugaktes an einem infizierten reservoirkompetenten Wirt oder durch „cofeeding“ erworben wurde. Eine Larve stammte von einem Rotkehlchen, das mit einer weiteren allerdings nicht infizierten Larve befallen war, sodass „cofeeding“ als Infektionsursache unwahrscheinlich scheint und das Rotkehlchen als bakteriämischer Infektionsherd anzunehmen ist. Die zweite Larve wurde einer Amsel entnommen, die mit einer weiteren mit Anaplasmen infizierten Nymphe infestiert war, sodass hier die Übertragung durch „cofeeding“ wahrscheinlich ist. Zum tatsächlichen Nachweis einer Bakteriämie im Wirtstier sind Blut- oder Gewebeproben der Vögel erforderlich. Dazu lag allerdings keine behördliche Genehmigung vor, weshalb diese Untersuchungen nicht möglich waren.

In einigen Studien konnten keine oder zum Teil nur sehr wenige mit Anaplasmen infizierte Larven identifiziert werden (Bjoersdorff et al. 2001, Paulauskas et al. 2009, Hildebrandt et al. 2010a), was gemeinsam mit den allgemein geringen Prävalenzen in vogelassoziierten Zecken zu der Vermutung geführt hat, dass Vögel keine oder lediglich inkompetente Reservoir für Anaplasmen darstellen (Aleksiev et al. 2001, Bjoersdorff et al. 2001, Skotarczak et al. 2006, Hildebrandt et al. 2010a). Diese Annahme wird unterstützt durch Studien, in denen neben

Zecken auch Blutproben von mit *I. ricinus* infestierten Vögeln entnommen und auf Anaplasmen untersucht wurden und diese ebenfalls negativ waren (Skotarczak et al. 2006, Skoracki et al. 2006). Dagegen spricht die hohe Prävalenzrate von 14,3 % für Anaplasmen, die in Larven in Norwegen ermittelt wurde (Paulauskas et al. 2009). Durch den Einsatz zweier verschieden spezifischer PCR-Methoden in dieser Studie ergaben sich jedoch neben den genannten Prävalenzen für *A. phagocytophilum* mit der unspezifischeren Methode wesentlich höhere Prävalenzen, sodass vermutet werden kann, dass neben *A. phagocytophilum* andere *Anaplasma* spp. oder *Ehrlichia* spp. in den untersuchten Vögeln vorkamen. Allerdings war nicht erkenntlich, ob die Larven die Infektionen durch „cofeeding“ erworben haben könnten. Dadurch wurde Vögeln in dieser Region eine Funktion als Wirt, jedoch nicht sicher als Reservoir für Anaplasmen zugeschrieben. Die Unterschiede in den Prävalenzraten sind möglicherweise endemisch bedingt und beeinflusst vom Zusammenspiel zwischen möglichen Vektoren, geeigneten Wirtstieren und entsprechenden klimatischen und ökologischen Bedingungen in unterschiedlichen geographischen Regionen (s. Kap. 2.1.5, S. 8).

Studien bezüglich der Saisonalität von Anaplasmeninfektionen in von Vögeln stammenden Zecken existieren kaum. Alekseev et al. ermittelten eine höhere Zahl von Anaplasmeninfektionen in *I. ricinus* im Herbst (51,8 %) als im Frühling (41,7 %) (Alekseev et al. 2001). In Reifenstein traten signifikant mehr Infektionen im Herbst (9,1 %) auf als im Sommer (0 %), doch ist es aufgrund der nur geringen Prävalenz nicht möglich, allgemeine Schlußfolgerungen bezüglich der Saisonalität aus den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zu ziehen.

Im Untersuchungsgebiet Reifenstein kann nicht auf Vögel als geeignetes Reservoir für Anaplasmen geschlossen werden. Die durchschnittlich hohen Infestationsraten von Vögeln mit *I. ricinus* (Bjoersdorff et al. 2001, Skotarczak et al. 2006), dem Hauptvektor für *A. phagocytophilum* in Europa (Beugnet und Marié 2009) sowie die Tatsache, dass in Vögeln aufgetretene Gensequenzen von *A. phagocytophilum* sich mit denen in an HGA erkrankten Patienten in Schweden, Slowenien und den USA deckten (Bjoersdorff et al. 2001), belegen jedoch, dass Vögeln eine wichtige Rolle in der Verbreitung sowohl von Vektoren wie *I. ricinus* als auch zeckenassoziierten Erregern wie *A. phagocytophilum* zukommt (Bjoersdorff et al. 2001, Hubálek 2004, Ogden et al. 2008, Hildebrandt et al. 2010a).

6.2.2 *Anaplasma phagocytophilum* in Zecken von Kleinsäugetieren

Insgesamt waren 1,8 % (3/166) der untersuchten Kleinsäugetiere mit mindestens einer infizierten Zecke infestiert. In anderen Studien wurden für Anaplasmen in Kleinsäugetieren höhere Präva-

lenzen von 5,3 % in Baden-Württemberg (Hartelt et al. 2008), 7,7 % in Bulgarien (Christova und Gladnishka 2005) und 9,5 % in der Schweiz (Liz et al. 2000) ermittelt. Die Gesamtprävalenz von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* von Kleinsäufern aus dem untersuchten Habitat war mit 1,1 % (3/273) gering. Dies ist zum einen durch den geringen Befall mit Nymphen, zum anderen durch die niedrigen Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in wirtsuchenden Zecken im Untersuchungsgebiet bedingt.

Die Infektionen traten ausschließlich bei *Ap. flavicollis* und nur in Larven auf. Da Anaplasmen nicht transovariell übertragen werden (Dumler et al. 2001) und alle drei infizierten Gelbhalsmäuse keine weiteren Infestationen mit Zecken aufwiesen, besteht die Möglichkeit, dass der Erreger von den infizierten Wirtstieren auf die *I. ricinus* Larven übertragen wurde und somit eine Reservoirfunktion besteht. Allerdings könnten ebenso andere infizierte *I. ricinus* zuvor am Wirt gesaugt haben, die bei der Entnahme der Zecken dann nicht mehr an diesem parasitierten und so der Untersuchung entgingen. Auch könnten die untersuchten Larven einen ersten unvollendeten Saugakt an einem anderen bakteriämischen Wirt vollzogen und den Erreger von diesem erhalten haben. Xenodiagnostische Studien mit sterilen Larven sowie Blut- oder Gewebeentnahmen der involvierten Kleinsäuger sind nötig, um eine Reservoirfunktion sicher zu bestätigen.

In der Literatur wurde *Apodemus* spp. mehrfach als Erregerreservoir für Anaplasmen festgestellt. So untersuchte Liz in der Schweiz Blut und Gewebeproben aus Milz, Leber und Ohr von Kleinsäufern, die zum einen mit infizierten, zum anderen mit nicht infizierten Zecken oder gar nicht infestiert waren, außerdem die gesogenen Zecken selbst und konnte Ehrlichien DNA in Blut und Gewebeproben nachweisen (Liz et al. 2000). Dies lässt auf eine Funktion von Kleinsäufern als natürlichem Reservoir für Anaplasmen in diesem Untersuchungsgebiet schließen. In Bulgarien wurden bei einem Drittel der untersuchten *Apodemus* spp. Anaplasmen gefunden (Christova und Gladnishka 2005). Eine Studie in der Slowakei ermittelte eine Seroprävalenzrate von 13,2 % für Anaplasmen in Kleinsäufern (Štefančíková et al. 2008). Negative Gewebeproben schließen jedoch eine Infektion der Wirtstiere und damit die Möglichkeit der Erregerübertragung auf die Vektoren nicht aus. Auch bei den untersuchten Biopaten in der Schweizer Studie wiesen nicht alle mit infizierten Zecken infestierten Kleinsäuger positive Gewebeproben auf (Liz 2000). Allerdings hängt die Durchseuchung der Kleinsäuger vom Befall mit infizierten Nymphen ab (Tälleklint und Jaenson 1994), die in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden konnten. In Kleinsäufern der Spezies *M. glareolus* aus Reifenstein konnten keine Infektionen mit *A. phagocytophilum* nachgewiesen

werden. Allerdings gelang dies in einer Studie aus Baden-Württemberg. In 13,4 % der untersuchten *M. glareolus* konnten dort Anaplasmen detektiert werden sowie in 0,5 % bei *Ap. flavicollis*, sodass beide Arten durchaus als Reservoir für Anaplasmen fungieren könnten (Hartelt et al. 2008). Zwischen beiden untersuchten Mäusearten in Reifenstein konnten keine Unterschiede im Befall mit Anaplasmen aufgezeigt werden. Allerdings detektierten Bown et al. in England wesentlich höhere Infektionszahlen mit *A. phagocytophilum* in Rötelmäusen als bei *Apodemus* spp. und vermuteten als Ursache, eine längere Persistenz der Infektion (Bown et al. 2003). Auch Liz et al. wiesen häufigere Infektionen bei Rötelmäusen (19,2 %) als in *Ap. flavicollis* (2,9 %) nach (Liz et al. 2000). In Deutschland existieren keine vergleichbaren Studien, außerdem war die Gesamtzahl der Anaplasmeninfektionen in Reifenstein sehr gering, sodass nicht schlüssig erörtert werden kann, weshalb sich im vorliegenden Untersuchungsgebiet gegenteilige Beobachtungen ergaben.

Aufgrund oben genannter Studien besteht Evidenz, dass in unterschiedlichen geographischen Regionen Kleinsäuger durchaus Reservoirfunktion für Anaplasmen übernehmen können. Es ist anzunehmen, dass auch im Untersuchungsgebiet Reifenstein zumindest *Ap. flavicollis* als Reservoirwirt für Anaplasmen fungiert. Allerdings sind Anaplasmen nur für kurze Zeit im Blutkreislauf des Wirtes nachweisbar, was die Möglichkeit einer Transmission und Reservoirfunktion einschränkt (Liz et al. 2000, Beugnet und Marié 2009) und mit für die in der vorliegenden Studie gemessenen geringen Prävalenzen verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund wird vermutet, dass Kleinsäuger auch kein Überwinterungsreservoir für Anaplasmen darstellen, sondern dies Zecken übernehmen (Bown et al. 2003, Beugnet und Marié 2009). Eine effektive Erregertransmission vom Wirt auf den Vektor ist außerdem, abgesehen von der transienten Bakteriämie im Wirtsorganismus, nur während einer begrenzten Zeitspanne möglich, da Kleinsäuger eine protektive Immunität gegen Anaplasmen entwickeln. Dizij und Kurtenbach konnten Immunität nach mehrfachem Befall mit Larven nur für Rötelmäuse, nicht jedoch bei *Ap. flavicollis* nachweisen (Dizij und Kurtenbach 1995). Auch dies könnte zu den geringen gemessenen Prävalenzen beigetragen haben, insbesondere dem Auftreten der Infektion bei Gelbhals-, nicht jedoch bei Rötelmäusen. Aus den oben genannten Gründen ist Kleinsäufern wohl keine uneingeschränkte Reservoirkompetenz zuzuschreiben. Aufgrund der sehr geringen Prävalenz kann keine Aussage bezüglich der Saisonalität der aufgetretenen Infektionen getroffen werden.

Im Untersuchungsgebiet Reifenstein konnten keine signifikanten Unterschiede im Befall mit *A. phagocytophilum* zwischen *I. ricinus* von Mäusen und Vögeln festgestellt werden. Jedoch

lassen sich Tendenzen erkennen. Es wiesen mehr Zecken von Vögeln (3,2 %) als solche von Mäusen (1,1 %) Infektionen auf, was auf eine größere Rolle von Vögeln als Wirt für Anaplasmen im untersuchten Habitat schließen lassen, allerdings auch methodisch bedingt sein könnte.

6.2.3 *Anaplasma phagocytophilum* in wirtssuchenden Zecken

Die Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in wirtssuchenden Zecken aus dem Freiland unterliegen regional starken Schwankungen. So wurden innerhalb Europas Prävalenzen von 0,4 % - 66,7 % beobachtet (Blanco und Oteo 2002). Neuere Studien gaben 0 % - 19,4 % in Norwegen (Radzijeuskaja et al. 2008, Rosef et al. 2009b), 0,7 % in Frankreich (Reis et al. 2011), 1,9 % in Luxemburg (Reye et al. 2010), 3 % in Litauen (Radzijeuskaja et al. 2008), 4,4 % in Italien und der Slowakei (Piccolin et al. 2006, Spitalská et al. 2008), 4,9 % in Polen (Wójcik-Fatla et al. 2009), 5,6 % in Spanien (Barandika et al. 2008), 9 % in Moldawien (Koči et al. 2007), 13,9 % in Serbien (Milutinović et al. 2008) und 23,6 % in Dänemark (Skarphéðinsson et al. 2007) an. In Deutschland reichten die Prävalenzen von 1 % in Süddeutschland (Hartelt et al. 2004) über 2,9 % in Bayern (Silaghi et al. 2008) bis zu 3,9 % in Berlin (Pichon et al. 2006) und 0 % - 5,4 % in Thüringen (Hildebrandt et al. 2002, Hildebrandt et al. 2010b).

Im Untersuchungsgebiet der vorliegenden Studie wurden keine Infektionen mit Anaplasmen in wirtssuchenden Zecken beobachtet. In Anbetracht der großen Schwankungen der Prävalenzraten in unterschiedlichen geographischen Regionen Europas ist das nicht ungewöhnlich. Das Vorkommen von zeckenassoziierten Erregern unterliegt einem komplexen Zusammenspiel von Verteilung und Abundanz möglicher Vektoren, potentiellen Wirten, Reservoiren sowie zahlreichen geographischen und klimatischen Faktoren in entsprechenden Habitaten (s. Kap. 2.1.5, S. 8). Innerhalb des untersuchten Habitates traten jedoch in *I. ricinus* von Kleinsäugern und Vögeln durchaus Infektionen mit *A. phagocytophilum* auf. Dass die wirtssuchenden Zecken nicht infiziert waren, kann zum einen durch die geringe Gesamtprävalenz von Anaplasmeninfektionen in der untersuchten Region erklärt werden, zum anderen könnte eine ineffiziente transstadiale Übertragung dafür verantwortlich sein.

6.3 *Rickettsia* spp.

6.3.1 *Rickettsia* spp. in Zecken von Vögeln

Die Gesamtprävalenz von Rickettsien in von Vögeln entnommenen *I. ricinus* war mit 2,1 % (4/189) in Reifenstein gering. Rickettsien waren die im untersuchten Habitat am seltensten in vogelassozierten Zecken nachgewiesenen Erreger. Es existieren nur wenige europäische Studien, die das Vorkommen von Rickettsien in von Vögeln stammenden Zecken untersuchten, häufig für andere Zeckenarten als *I. ricinus* (Ioannou et al. 2009). In Norddeutschland wiesen 7,3 % der Zecken Rickettsieninfektionen auf (Hildebrandt et al. 2010a), in Schweden waren 11,3 % der untersuchten von Vögeln stammenden Zecken mit Rickettsien infiziert (Elfving et al. 2010), in einer Studie in Russland sogar 15,1 % (Movila et al. 2011). Dagegen wiesen Spitalská et al. in den Karpaten nur bei einer Nymphe eines Rotkehlchens von insgesamt 142 untersuchten vogelassozierten Zecken Rickettsien nach (Spitalská et al. 2006). Die Unterschiede in den Prävalenzraten sind wie auch in der Epidemiologie der anderen untersuchten Erreger auf unterschiedlichste klimatische, ökologische, geographische sowie das Zusammenspiel von geeigneten Wirten, Vektoren und Reservoiren betreffende Einflüsse zurückzuführen (s. Kap. 2.1.5, S. 8). In den oben genannten Studien lag der Anteil von *R. helvetica* in allen positiven Proben sowohl in Schweden als auch in Russland deutlich über dem an *R. monacensis* (Elfving et al. 2010, Movila et al. 2011). In Norddeutschland zeigte sich dagegen ein umgekehrtes Verhältnis von *R. helvetica* (7,1 %) zu *R. monacensis* (42,9 %), wobei 50 % der Proben lediglich als *Rickettsia* spp. identifiziert werden konnten, sodass die Speziesverhältnisse nicht endgültig geklärt sind (Hildebrandt et al. 2010a). Aufgrund der nur geringen Zahl an detektierten Rickettsieninfektionen in Reifenstein (1 x *R. helvetica*, 2 x *R. monacensis*, 1 x *Rickettsia* spp.) kann kein Rückschluß auf eventuelle speziesspezifische Wirt- oder Reservoirkompetenz von Vögeln in diesem Habitat getroffen werden, zumal Koinfektionen einer Zecke mit verschiedenen Rickettsienspezies nicht erfasst wurden (s. Kap. 6.6, S. 94).

Alle vier detektierten Infektionen fanden sich ausschließlich bei Nymphen, die zwei verschiedenen Amseln entnommen worden waren. Beide Vögel waren mit weiteren pathogenträgenden Larven und Nymphen infestiert. An einem Vogel fand sich keine weitere rickettsieninfizierte Zecke. Drei der detektierten Infektionen wurden jedoch in Zecken festgestellt, die alle derselben Amsel entnommen worden waren, sodass in diesen Fällen „cofeeding“ ein möglicher Übertragungsweg sein könnte. Die höhere bzw. in der vorliegenden Studie ausschließliche Prävalenz in Nymphen kann zum einen durch die aufgrund der

Menge an Blutmahlzeiten generell größere Wahrscheinlichkeit einer Infektion in höheren Entwicklungsstadien erklärt werden (Süß und Schrader 2004), ist zum anderen aber auch auf die stärkere Infestation der Vögel mit Nymphen verglichen mit Larven oder Adulten im Untersuchungsgebiet zurückzuführen.

Alle in Reifenstein nachgewiesenen Rickettsien-Infektionen traten im Frühling auf. Dies lässt die Überlegung zu, dass die Vögel die Erreger aus ihren Überwinterungsgebieten mitgebracht haben könnten. *Rickettsia monacensis* wurde häufig in Südeuropa beschrieben (Jado et al. 2007, Márquez 2008) und könnte durch dort überwinternde oder die Region während der Migration passierende Zugvögel in den Norden verbreitet werden (Elfving et al. 2010). Der hohe Anteil an *R. monacensis* Infektionen in Zecken von Vögeln und deren überwiegendes Auftreten im Frühling in einer Studie in Norddeutschland könnten diese Hypothese bestätigen (Hildebrandt et al. 2010a). Allerdings wurde in Reifenstein lediglich eine *R. monacensis* Infektion nachgewiesen und die involvierten Vogelspezies waren ausschließlich Amseln, die als Teilzieher gelten (Franke 2010), sodass nicht mit Sicherheit auf die Herkunft der Erreger aus dem Mittelmeerraum geschlossen werden kann.

In der vorliegenden Studie gelang zum ersten Mal der Nachweis von Rickettsien in von Vögeln stammenden *I. ricinus* in Mitteldeutschland. Aufgrund der geringen Prävalenz und der Möglichkeit transovarierlicher Erregerübertragung, die zumindest für *R. helvetica* beschrieben ist (Burgdorfer et al. 1979), kann jedoch keine eindeutige Aussage bezüglich der Reservoirkompetenz von Vögeln gegenüber *Rickettsia* spp. im Untersuchungsgebiet getroffen werden. Dafür wären xenodiagnostische Untersuchungen mit sterilen Larven und rickettsiämischen Wirten erforderlich. Dennoch kann Vögeln, insbesondere der Gattung *Turdus* in ihrer Funktion als Wirte für Rickettsien, eine Rolle bei der geographischen Verbreitung der Erreger über längere Distanzen zugeschrieben werden (Ioannou et al. 2009, Franke 2010, Elfving et al. 2010).

6.3.2 *Rickettsia* spp. in Zecken von Kleinsäugetieren

Bei 3% (5/166) der untersuchten Kleinsäugetiere konnten mit Rickettsien infizierte Zecken nachgewiesen werden, wobei innerhalb der untersuchten Spezies keine relevanten Unterschiede zu verzeichnen waren. Die Prävalenz für *Rickettsia* spp. in von Kleinsäugetieren stammenden *I. ricinus* lag bei 1,8 % (5/273) und ist der erste Nachweis von *Rickettsia* spp. in Zecken von Kleinsäugetieren in Deutschland. Gegenwärtig existieren nur wenige Studien, die das Vorkommen von Rickettsien in Kleinsäugetieren zum Gegenstand haben. In der Slowakei konnten

bei keinem der untersuchten *Ap. flavicollis* Rickettsien nachgewiesen werden (Spitalská et al. 2008). Auch in Süddeutschland wurde bei keinem der untersuchten Kleinsäuger eine Infektion mit Rickettsien ermittelt (Hartelt et al. 2008). Schex et al. wiesen allerdings in Gewebeproben von Kleinsäufern in Bayern bei sieben von 124 Kleinsäufern *R. helvetica* bzw. *R. felis* nach (Schex et al. 2011). Der Großteil der Untersuchungen bezüglich der Rolle von Rickettsien im Transmissionszyklus von Nagern beruht auf Seroprävalenzstudien. In China wurden Seroprävalenzen von 9,1 % beschrieben (Zhan et al. 2009).

Die Infektionen in Reifenstein traten ausschließlich bei Larven auf und bis auf eine Infektion, bei der lediglich *Rickettsia* spp. bestimmt werden konnte, wurde ausschließlich *R. helvetica* nachgewiesen. Bei einer vergleichbaren Studie in Polen trat *R. helvetica* in 2,1 % der Larven und 8 % der untersuchten Nymphen von Kleinsäufern auf (Stańczak et al. 2009). Die Tatsache, dass im hier untersuchten Habitat keine Nymphen Infektionen aufwiesen, kann mit der generell geringen Zahl von an den Kleinsäufern parasitierenden Nymphen (4,8 %) erklärt werden. Da lediglich eine geringe Zahl an Infektionen detektiert wurde, können keine Aussagen bezüglich eines saisonal variierenden Auftretens des Erregers in Zecken von Kleinsäufern getroffen werden.

Aufgrund der geringen Prävalenz sowie der Möglichkeit transovarieller Übertragung für Rickettsien kann vom aufgetretenen Vorkommen des Erregers in Larven von Kleinsäufern in Reifenstein nicht auf deren Rolle als Erregerreservoir geschlossen werden. Zur Bestätigung einer solchen Funktion wären xenodiagnostische Untersuchungen mit rickettsiämischen Wirtstieren und sterilen Larven notwendig.

6.3.3 *Rickettsia* spp. in wirtssuchenden Zecken

Bei 4,1 % (8/196) der aus dem Freiland stammenden Zecken im untersuchten Habitat konnten Rickettsien nachgewiesen werden, eine Zahl, die sich mit ähnlichen europäischen Studien deckt. Innerhalb Europas reichen die Prävalenzen für *R. helvetica* von 0,9 % - 13 % (Stańczak 2006, Bertolotti et al. 2006, Skarphéðinsson et al. 2007, Márquez 2008, Stańczak et al. 2008, Svedsen 2009, Hornok et al. 2009, Kantsø et al. 2010, Reis et al. 2011, Reye et al. 2010) und für *R. monacensis* von 1,4 % - 9,9 % (Márquez 2008, Hornok et al. 2009, Reye et al. 2010). Bei nicht näher klassifizierten Spezies erreicht die Prävalenz in Italien sogar 33,1 % - 36,6 % (Bertolotti et al. 2006). Vergleichbare Studien in Deutschland ergaben Prävalenzen von 3,5 % - 12 % für *R. helvetica* in Süddeutschland (Hartelt et al. 2004, Wölfel et al. 2006, Dobler und Wölfel 2009) und 14,2 % in Brandenburg (Pichon et al. 2006). Prävalenzen von

0,6 % für *R. monacensis* und 1,7 % für *R. massiliae* werden beschrieben (Dobler und Wölfel 2009). Eine Studie in Thüringen konnte bei 14,7 % der wirtssuchenden Zecken *Rickettsia* spp. spezifische DNA nachweisen (Hildebrandt et al. 2010b). Das regional unterschiedliche Vorkommen ist zum einen durch das Zusammenspiel ökologischer, klimatischer und die Vektor-Wirt-Beziehung betreffende Faktoren zu erklären, zum anderen unterliegen die Prävalenzen auch innerhalb eines Habitates jährlichen Schwankungen (Hildebrandt et al. 2010b).

Bei sechs der acht rickettsienpositiven Proben der vorliegenden Untersuchung konnte lediglich *Rickettsia* spp. ermittelt werden (s. Kap. 6.6, S. 94). Bei den per Sequenzierung eindeutig einer Spezies zuordbaren Proben ergab sich ausschließlich *R. helvetica*. Diese Beobachtung wird gestützt von anderen Studien sowohl in Deutschland (Hartelt et al. 2004, Pichon et al. 2006, Wölfel et al. 2006) als auch Polen (Stańczak et al. 2008), der Slowakei (Spitalská et al. 2008) und Dänemark (Svedsen et al. 2009, Kantsø et al. 2010), die ausschließlich *R. helvetica* in wirtssuchenden Zecken ermittelten.

Zwei der Infektionen traten im Frühling, sechs bei im Herbst gesammelten Zecken auf. Im Sommer konnten keine Rickettsieninfektionen nachgewiesen werden. Obgleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektionszahlen zu verschiedenen Fangperioden ermittelt wurden, konnte ein Absinken der Infektionszahl im Sommer beobachtet werden. Kantsø et al. beschrieben in Dänemark den Höhepunkt der Rickettsieninfektionen im Mai (7,1 %), beobachteten ein Absinken im Juli (3,1 %) und einen erneuten Anstieg in August und Oktober (4 %) und vermuteten, dass die Zahl der Rickettsieninfektionen tendenziell abhängig von der Fangperiode zu sein scheint, da sie jährlichen Variationen unterliege (Kantsø et al. 2010). In Thüringen ergaben sich dagegen bei *I. ricinus* Infektionshöhepunkte in Juli und August (Hildebrandt et al. 2010b). Es sind somit Studien in größerem Umfang nötig, um oben genannte Hypothese zu bestätigen.

6.4 *Babesia* spp.

6.4.1 *Babesia* spp. in Zecken von Vögeln

Im untersuchten Habitat in Reifenstein lag die Prävalenz von *Babesia* spp. in von Vögeln stammenden Zecken bei 13,2 % (25/189). Eine weitere deutsche Studie an der Ostsee ermittelte bei 4,7 % *Babesia* spp. (Hildebrandt et al. 2010a). Insgesamt existieren nur wenige Studien, die das Vorkommen von Babesien in vogelassoziierten Zecken zum Gegenstand haben. Innerhalb Europas variieren die Prävalenzen von 0 % (Polen) bis zu 1,6 % (Russland)

(Skotarczak et al. 2006, Movila et al. 2011). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Prävalenz liegt somit deutlich über den bisher ermittelten Werten.

In acht Proben konnten per Sequenzanalyse *B. microti* nachgewiesen werden, doppelt so häufig traten jedoch Infektionen mit *B. divergens* auf. In der norddeutschen Studie war das Verhältnis beider Spezies mit vier bzw. fünf Infektionen nahezu ausgeglichen (Hildebrandt et al. 2010a). Interessant ist die Tatsache, dass *B. microti* in vier Nymphen, jedoch auch in vier Larven nachweisbar war. An keinem der Vögel, die mit *B. microti* infizierte Larven trugen, waren weitere mit diesem Pathogen befallene Zecken zu finden. Da die Möglichkeit transovarieller Übertragung für diese Spezies wahrscheinlich nicht besteht (Homer et al. 2000) und auch „cofeeding“ nicht beschrieben ist (Hildebrandt et al. 2011), kann angenommen werden, dass der Erreger durch einen parasitärischen Vogel übertragen worden ist. Aus diesem Grund kann für Vögel im untersuchten Habitat eine Rolle als Reservoir zumindest für *B. microti* angenommen werden. Für *B. divergens*, für die auch transovariable Transmission beschrieben ist (Homer et al. 2000), kann keine sichere Aussage über eine Reservoirfunktion getroffen werden. Jedoch ist anzunehmen, dass Vögeln auch für diese Erregerart zumindest eine Rolle bei der Verbreitung der Pathogene zukommt.

6.4.2 *Babesia* spp. in Zecken von Kleinsäugetieren

In der vorliegenden Studie wurden erstmals Prävalenzdaten für *Babesia* spp. in Zecken von Kleinsäugetieren innerhalb Deutschlands erhoben. Die Babesienprävalenz in *I. ricinus* lag bei 6,6 % (18/273). Es existieren gegenwärtig nur sehr wenige Studien, die Zecken von Kleinsäugetieren auf Babesien untersuchten. In einer Studie in Polen wurde eine Prävalenz von 3,5 % ermittelt. Dabei waren mehr Nymphen (4,8 %) als Larven (3,4 %) von Kleinsäugetieren infiziert (Welc-Falęciak et al. 2008). In einer weiteren Untersuchung ergab sich in kleinsäugetierassoziierten Zecken eine Prävalenz von 0,6 % (Siński et al. 2006a). In Reifenstein zeigten signifikant mehr Nymphen (30,8 %) als Larven (5,4 %) pathogene Spezies. Dieser Unterschied wird auch bei separater Betrachtung der einzelnen Erreger deutlich, da auch *B. microti* signifikant häufiger in Nymphen (23,1 %) als Larven (2,7 %) nachzuweisen war. Das häufigere Auftreten von *B. microti* in Nymphen war jedoch wegen der nicht vorhandenen transovariellen Erregerübertragung für diese Spezies zu erwarten (Homer et al. 2000). Dennoch konnte in sieben Larven *B. microti* detektiert werden. Da „cofeeding“ bei Babesien nicht beschrieben ist (Hildebrandt et al. 2011), können die Infektionen von einem parasitärischen Wirt auf die Larven übertragen worden sein, obgleich auch die Möglichkeit besteht, dass die

Larven zuvor an einem anderen Wirt den Saugakt unbeendet vollzogen und die Infektion dort erworben haben. Aus diesen Gründen können im untersuchten Habitat Kleinsäuger als Erregerreservoir zumindest für *B. microti* angenommen werden. Da *B. divergens* jedoch auch transovariell übertragen werden kann, sind weitere xenodiagnostische Tests mit sterilen Larven notwendig, um die Rolle von Kleinsäufern als potentielles Reservoir auch für diese Spezies zu bestätigen. In Blutanalysen konnten in Polen bei 13,1 % von *Ap. flavicollis* und 11,9 % von *M. glareolus* Babesien nachgewiesen werden (Welc- Fałęciak et al. 2008). In einer weiteren Studie fanden sich bei 1 % von *Ap. flavicollis* Babesien (Siński et al. 2006a). Hartelt et al. gelang bei 1,3 % von *M. glareolus*, nicht jedoch bei *Ap. flavicollis* der Nachweis von *Babesia* spp. (Hartelt et al. 2008). In Kroatien waren 16,2 % der untersuchten *M. glareolus* und *Ap. flavicollis* sowohl mit azoonotischen als auch mit zoonotischen Babesiensstämmen infiziert (Beck et al. 2011). Da in der vorliegenden Arbeit beide Kleinsäugerspezies mit *B. microti* infizierte Larven aufwiesen, können beide Arten als Erregerreservoir für diese Babesienspezies angenommen werden. Zur Bestätigung dieser Vermutung sind allerdings weitere xenodiagnostische Untersuchungen mit sterilen Larven erforderlich.

Bei Betrachtung der Infektionszahlen zu verschiedenen Jahreszeiten zeigte sich sowohl für *Babesia* spp. als auch *B. divergens* im Besonderen ein signifikanter Anstieg der Infektionen vom Frühling (3,4 % bzw. 0,7 %) zum Sommer (10,1 % bzw. 6,7 %) ($p=0,048$; $p=0,013$). Einen Grund stellen die verminderte Zeckenaktivität während der Wintermonate und daraus resultierend die geringeren Infektionschancen dar. Zum anderen könnte, wie bei Borrelien, das Sterben infizierter Wirtstiere im Winter verantwortlich sein (Tälleklint und Jaenson 1995). Bei *B. microti* handelt es sich um einen Spezieskomplex (Goethert und Telford 2003), der genetisch verschiedene sowohl zoonotische als auch azoonotische Stämme beinhaltet. Es ist noch unklar, inwieweit verschiedene Stämme derselben Spezies sich in Virulenz, Transmission und Pathogenität unterscheiden (Hildebrandt et al. 2008). Differenzen zwischen ermittelten Erregerprävalenzen in Vektoren oder Wirten und dem tatsächlichen Auftreten von Infektionen auch beim Menschen können u.U. durch diese Variabilität erklärt werden. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet zur Identifikation und Charakterisierung dieser verschiedenen Stämme sind unerlässlich, um ein mögliches Risiko für den Menschen abschätzen zu können.

6.4.3 *Babesia* spp. in wirtssuchenden Zecken

Innerhalb Deutschlands liegen die bisher ermittelten Prävalenzen für *B. divergens* bei 0,9 %, für *B. microti* bei 0,1 % in *I. ricinus* in Süddeutschland (Hartelt et al. 2004) und bei 5 % für *Babesia* spp. in Thüringen (Pauliks 2009), sodass das in der vorliegenden Studie detektierte Vorkommen von 10,7 % abweicht. Betrachtet man jedoch die Häufigkeit im Auftreten von *Babesia* spp. in Zecken aus dem Freiland innerhalb Europas, beobachtet man deutliche regionale Schwankungen. Die Prävalenzen reichen für *B. microti* von 1,9 % - 13,3 % (Polen) über 0,9 % (Ungarn) bis zu 7,4 % (Slowenien) (Duh et al. 2001, Kuzna-Grygiel et al. 2002, Skotarczak et al. 2003, Kálmán et al. 2003, Wójcik-Fatla et al. 2006). *Babesia divergens* erreicht Prävalenzen von 0,9 % und 2 % in Norwegen und Litauen und eine außergewöhnlich hohe Prävalenz von 51,7 % in Österreich (Radzijeuskaja et al. 2008, Blaschitz et al. 2008). *Babesia venatorum* (EU1) wurde in der Schweiz zu 0,7 % - 1,3 % entdeckt (Casati et al. 2006). Studien ohne nähere Speziesklassifikation zeigen Prävalenzen von 1,6 % (Italien), 2,7 % (Luxemburg) bis 20,6 % (Frankreich) (Halos et al. 2005, Piccolin et al. 2006, Reye et al. 2010). Somit sind auch die innerhalb Deutschlands auftretenden Prävalenzunterschiede auf unterschiedlichste klimatische, geographische und ökologische Faktoren zurückzuführen (s. Kap. 2.1.5, S. 8). Im untersuchten Habitat in Reifenstein traten die Infektionen in 20 Nymphen, jedoch nur einer adulten *I. ricinus* auf. In der Mehrzahl der Studien ist ein umgekehrtes Verhältnis zu beobachten. So fanden sich in Norwegen und Litauen ausschließlich Adulte infiziert (Radzijeuskaja et al. 2008), in Polen sowie einer deutschen und einer französischen Studie ergaben sich signifikant mehr Infektionen in Adulten verglichen mit Nymphen (Halos et al. 2005, Wójcik-Fatla et al. 2006, Pauliks 2009) und in Luxemburg traten Infektionen mit *B. microti* nahezu doppelt so häufig in adulten *I. ricinus* auf (Reye et al. 2010). Die geringe Zahl an Infektionen in adulten Stadien in Reifenstein lässt sich zum einen mit den geringeren Fangzahlen erklären, zum anderen könnte auch eine ineffiziente transstadiale Übertragung von Nymphen auf Adulte die Beobachtung erklären.

Das Verhältnis der in Reifenstein detektierten Infektionen mit *B. divergens* und *B. microti* zeigte sich mit zehn bzw. elf Infektionen ausgeglichen. In einer früheren Thüringer Studie wurde *B. microti* etwas häufiger als *B. divergens* nachgewiesen (28/1000 vs. 20/1000) (Pauliks 2009). Hartelt et al. ermittelten dagegen in Baden-Württemberg zu 0,9% *B. divergens* und nur zu 0,1 % *B. microti* (Hartelt et al. 2004). In Luxemburg dominierte der Anteil an *B. microti* (35,1 %) in *I. ricinus* deutlich gegenüber *B. divergens* (2,7 %) (Reye et al. 2010).

In Reifenstein traten bei im Frühling gesammelten *I. ricinus* signifikant häufiger Infektionen auf als in vom Herbst stammenden Zecken (25 % vs. 7,9 %; $p=0,007$). Bei separater Betrachtung der Infektionszahlen mit den unterschiedlichen Babesienspezies zeigte sich diese Beobachtung auch bei *B. microti* (16,7 % vs. 3,3 %; $p=0,007$). Saisonale Schwankungen der Infektionszahlen für Babesien wurden in nur wenigen anderen Studien betrachtet. Reye et al. beobachteten in Luxemburg die höchste Prävalenz für *Babesia* spp. im September (Reye et al. 2010) und ein Absinken im Juli und August. In Thüringen wurde dagegen das Infektionsmaximum im Juli und August gemessen (Pauliks 2009). Diese Unterschiede könnten auf verschiedene äußere wie klimatische oder ökologische Einflüsse zurückzuführen sein, die den Vektor dazu zwingen, sein Verhalten an die wechselnden Bedingungen anzupassen. So führt Trockenheit, die zumeist in den heißen Sommermonaten auftritt, zu verzögerter Wandlung in das nächste Entwicklungsstadium und zu geringerer wirtssuchender Aktivität, was ein Absinken der Infektionszahlen in diesen Monaten zur Folge hat.

Das Vorkommen verschiedener *Babesia* Spezies im untersuchten Habitat belegt die Dringlichkeit weiterer epidemiologischer und seroepidemiologischer Untersuchungen, um ein von diesen Erregern ausgehendes Risiko für den Menschen abschätzen zu können.

6.5 Koinfektionen

In einer Studie in den USA wurden Koinfektionsraten von 39 % bei Lymeborreliose-Patienten ermittelt (Krause et al. 2002). Eine weitere prospektive nordamerikanische Arbeit untersuchte 671 Personen mit hoher Exposition und damit verbundenem Risiko für zeckenassoziierte Infektionen. Nach einem Jahr konnten jedoch in keinem Fall Serokonversionen für zwei oder mehr Pathogene nachgewiesen werden (Hilton et al. 1999), was für ein relativ geringes Risiko, selbst in zeckenexponierten Regionen spricht, Koinfektionen zu erwerben.

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt bei 0,6 % (4/658) aller *I. ricinus* Koinfektionen mit Kombinationen der untersuchten „emerging pathogens“ detektiert, das entspricht 4,7 % (4/86) aller positiv getesteten Zecken. Zwei weitere Arbeitsgruppen, die neben den in dieser Arbeit untersuchten Pathogenen die Prävalenz von *Borrelia* spp. und *Francisella tularensis* in denselben vogel-, kleinsäuger- und freilandassoziierten Zecken untersuchten, ermittelten eine Koinfektionsprävalenz für alle fünf Erregergattungen von 10,9 % (15/137) (Franke et al. 2010, Franke 2010). Dabei trat die Kombination von *Borrelia* spp. und *Babesia* spp. am häufigsten auf (5/15). Andere Kombinationen waren *Borrelia* spp. - *Rickettsia* spp. (2/15), *Babesia* spp. - *Rickettsia* spp. (2/15), *Babesia* spp. - *A. phagocytophilum* (2/15) und Koinfektionen verschiedener Borreliengenospezies (4/15) (s. Tab. 27, S. 67). Die meisten aller

aufgetretenen Koinfektionen fanden sich in an Vögeln parasitierenden Zecken (16,1 %), gefolgt von wirtssuchenden *I. ricinus* (10,7 %). Am seltensten traten Mehrfachinfektionen bei kleinsäugerassozierten Zecken auf (6,6 %) (Franke et al. 2010). Der Anteil der koinfizierten Zecken an allen in der vorliegenden Studie untersuchten infizierten *I. ricinus* betrug daher unter Berücksichtigung der fünf Erregergruppen 16,7 % (15/90), was den beträchtlichen Anteil der Borrelieninfektionen an zeckenassozierten Pathogenen im Untersuchungsgebiet verdeutlicht.

Innerhalb Europas reichen die Prävalenzen für Mehrfachinfektionen mit Kombinationen von *Bo. burgdorferi*, *B. microti* und *A. phagocytophilum* bei *I. ricinus* von <1 % bis 13 % (Swanson et al. 2006). In den USA dagegen wurden bei 1 % bis 28 % von *I. pacificus* bzw. *I. scapularis* Koinfektionen dieser drei Erreger ermittelt (Swanson et al. 2006). Die in Reifenstein aufgetretenen Koinfektionen von Anaplasmen, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. fanden sich jeweils zu 0,4 % in Zecken zweier Amseln (*B. divergens* + *A. phagocytophilum*, *B. divergens* + *Rickettsia* spp.), einer Gelbhalsmaus (*B. divergens* + *A. phagocytophilum*) und einer wirtssuchenden *I. ricinus* Zecke (*B. divergens* + *Rickettsia* spp.) (s. Tab. 27, S. 67). In der Literatur finden sich nur wenige Nachweise dieser Erregerkombinationen in *I. ricinus*. Mehrheitlich werden Koinfektionen beobachtet, bei denen *Borrelia* spp. als Erreger involviert ist (Fingerle et al. 1999, Christova et al. 2001, Oehme et al. 2002, Hildebrandt et al. 2003, Halos et al. 2005, Reye et al. 2010), was wohl auch auf die größere Anzahl an vorhandenen Studien mit diesem Erreger zurückzuführen ist. In Polen traten Koinfektionen von *Babesia* spp. mit *A. phagocytophilum* in wirtssuchenden Zecken mit 1,1 % (Wójcik-Fatla et al. 2009) bzw. 2 % (Stańczak et al. 2004) in *I. ricinus* auf. Eine Untersuchung von wirtssuchenden *I. ricinus* in Thüringen ergab zu 1,9 % Koinfektionen von *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. und zu 0,2 % die Kombination *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* (Pauliks 2009).

Studien über Koinfektionen in von Vögeln stammenden Zecken sind rar. Alekseev et al. beschrieb in Russland bei fünf von acht mit Anaplasmen infizierten *I. ricinus* von Vögeln das gleichzeitige Auftreten von *Borrelia* spp. (Alekseev et al. 2001). Eine Untersuchung aus Norddeutschland ermittelte bei 1 % der untersuchten Zecken von Vögeln Koinfektionen von *A. phagocytophilum* mit *R. monacensis* sowie *B. microti* mit *R. monacensis* (Hildebrandt et al. 2010a). Diese beiden sind die einzigen derzeit existierenden Studien, die Koinfektionen in von Vögeln stammenden *I. ricinus* beschreiben. Somit liefert die vorliegende Arbeit erste Daten über mögliche Koinfektionen in Vögeln bzw. vogelassozierten Zecken in Mitteldeutschland. Bezogen auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pathogene

einschließlich der Borrelien wiesen zehn von Vögeln stammende Zecken Koinfektionen auf. Insgesamt waren 17,9 % (10/56) der untersuchten Vögel mit Zecken infestiert, die mit verschiedenen Pathogenen befallen waren. Betrachtet man die involvierten Vogelspezies war ein Drittel (8/24) der Amseln mit verschiedene Erreger tragenden Zecken infestiert. Unter Einbeziehung der Daten von Franke et al. trug eine Amsel sechs mit verschiedenen Erregerspezies infizierte Zecken (*Bo. bavariensis*, *Bo. valaisiana* Subtyp II, *A. phagocytophilum*, *R. monacensis*, *R. helvetica*, *B. divergens*) (Franke et al. 2010) (s. Tab. 27, S. 67). Obgleich nicht alle der Vögel auch tatsächlich mit diesen Erregern infiziert sind, unterstreicht dies doch ihre Rolle bei der Verbreitung einer Vielzahl zeckenassoziierter Pathogene.

Bei Kleinsäugetieren aus Reifenstein war der Anteil der Individuen, die Zecken mit mehreren Pathogenen trugen mit 2,4 % (4/166) deutlich geringer. Dies deutet darauf hin, dass im untersuchten Habitat Vögel ein größeres Spektrum an Pathogenen beherbergen können. In Irland ergab die Untersuchung auf Wirts- und Borrelien-DNA in ungesogenen Freilandnymphen in 18 Fällen Singvogel-DNA und nur in einer Nymphe solche von Kleinsäugetieren, was auch in dieser Region auf eine bedeutendere Rolle von Vögeln als Verbreiter zeckenassoziierter Pathogene verglichen mit Kleinsäugetieren schließen lässt (Pichon et al. 2005). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Arbeit aus Spanien, die ebenfalls ermittelte, dass ein Großteil der wirtssuchenden Zecken an Vögeln statt an Kleinsäugetieren gesaugt hatte (Estrada-Peña et al. 2005).

Über die Prävalenzen von Koinfektionen in von Kleinsäugetieren stammenden Zecken existieren ebenfalls nur wenige Studien. In der Slowakei ergab die Untersuchung von Gewebeproben von *Ap. flavicollis* sowie parasitierenden Larven keine Koinfektionen (Spitalská et al. 2008). Dagegen ermittelten Štefančíková et al. bei 1,8 % in Ohrbiopaten von untersuchten Kleinsäugetieren Koinfektionen von Borrelien und *A. phagocytophilum* (Štefančíková et al. 2008).

Das Auftreten von Koinfektionen in Freiland- und an verschiedenen Wirtsspezies parasitierenden *I. ricinus* zeigt die Interaktion der Transmissionszyklen verschiedener zeckenassoziierter Pathogene im Untersuchungsgebiet (Swanson et al. 2006). Die vorgelegten Daten verdeutlichen angesichts der Häufigkeit von Koinfektionen in *I. ricinus* sowie der mannigfaltigen Kombinationen involvierter Erregerspezies, dass sowohl für Säugetierwirte als auch den Menschen im untersuchten Habitat Reifenstein das Risiko besteht, Mehrfachinfektionen mit diesen Pathogenen zu erwerben. Dieses Risiko unterstreicht die von Krause et al. bereits 2002 dokumentierte Notwendigkeit der Etablierung neuer Standards in Diagnostik und Therapie von zeckenassozierten Erkrankungen (Krause et al. 2002).

6.6 Methodik

Der Nachweis von *A. phagocytophilum* durch Amplifizierung eines Abschnittes des 16S rRNA Gens mittels PCR ergab in der Gelelektrophorese einige Proben, die nicht eindeutig als positiv zu bewerten waren. Abschnitte des 16S rRNA Gens werden häufig zum Nachweis von *Anaplasma* spp. verwendet. Möglich wäre jedoch auch die Anwendung einer Real-time-PCR mit Zielgenen wie dem Oberflächenprotein Msp2 zur Erhöhung der Spezifität (Courtney et al. 2004, Messerer 2006, Paulauskas et al. 2009) oder eine „nested“-PCR (Massung et al. 1998, Štefančíková et al. 2008).

Die in der PCR amplifizierte Region des Zitratsynthasegens *glta* zum Nachweis von *Rickettsia* spp. erwies sich nicht als geeignet, um sicher zwischen verschiedenen Rickettsienspezies differenzieren zu können, was allerdings auch nicht das primäre Ziel dieser Arbeit war. So konnte in der vorliegenden Untersuchung bei einigen Proben lediglich *Rickettsia* spp. ermittelt werden. Die Ursache dafür liegt in der großen genetischen Ähnlichkeit, die im amplifizierten Bereich des *glta* Gens zwischen verschiedenen Rickettsienspezies herrscht. So unterscheidet sich *R. monacensis* in 5 (5/340, 1,5 %) , *R. helvetica* in nur vier Basenpaaren (4/340, 1,2 %) von anderen in Deutschland vorkommenden Rickettsienspezies (Hildebrandt et al. 2010b). Hinter den hier angegebenen Sequenzierungsergebnissen von *Rickettsia* spp. können sich daher andere SFG-Rickettsien oder aber auch Koinfektionen mit verschiedenen Rickettsienspezies verbergen. Die Amplifizierung eines anderen Genabschnittes oder des 16S rRNA (*rrs*) Gens, *ompA*, *ompB* und Gen D könnten zur weiteren Analyse herangezogen werden (Parola et al. 2005b) und scheinen unter Umständen hierfür geeigneter (Hildebrandt et al. 2010b).

Der Nachweis von *Babesia* spp. über Amplifizierung eines 284 bp langen Fragmentes des 18S rRNA Gens mittels PCR erwies sich als nicht sehr spezifisch, da sich in der anschließenden Gelelektrophorese zahlreiche unspezifische Banden zeigten. Auch die nachfolgende Restriktion mit dem Enzym *AluI* ergab zum Teil nicht sicher als positiv oder negativ klassifizierbare Resultate, sodass erst durch die Sequenzierung ein eindeutiger Erregernachweis gelang. Dies könnte auf die Wahl der verwendeten Primer zurückzuführen sein. Denkbar wäre somit in künftigen Studien andere Primer bzw. die Amplifikation eines anderen Genabschnittes zu wählen, um bereits in der PCR eindeutigere Ergebnisse zu erhalten wie bei Pauliks beschrieben (Pauliks 2009). Nicht auszuschließen ist zudem, dass sich unter den als *B. divergens* ermittelten Infektionen nicht auch solche mit *Babesia* sp. EU1 befinden. Für diese Spezies wurden z.T. hohe Prävalenzen innerhalb Europas ermittelt. Beispielsweise wurden in Luxem-

burg 59,5 % aller Babesieninfektionen in *I. ricinus* durch *Babesia* sp. EU1 verursacht (Reye et al. 2010) und der erste Fall einer humanen Babesieninfektion in Deutschland geht auf diese Spezies zurück (Häselbarth et al. 2007). Die Sequenzen von *B. divergens* und *Babesia* sp. EU1 unterscheiden sich in lediglich 31 Basenpaaren (Herwaldt et al. 2003), sodass die Amplifizierung des gesamten 18S rRNA Gens (1700 bp) nötig wäre, um sicher zwischen *B. divergens* und *Babesia* sp. EU1 unterscheiden zu können (Hunfeld et al. 2008, Hildebrandt et al. 2008), weshalb in der vorliegenden Untersuchung nicht eindeutig zwischen beiden Arten differenziert werden konnte. Denkbar wäre auch die Verwendung eines anderen Gens zur Speziesdifferenzierung. Allerdings liegen die Sequenzen anderer Gene der zu unterscheidenden Spezies nicht vollständig vor, sodass auch keine entsprechenden PCR-Protokolle existieren.

Ingesamt erwies sich die Restriktion als nicht zielführend, was die eindeutige Differenzierung zwischen in der PCR negativen und positiven Amplifikaten betrifft, weshalb sich viele der in der Restriktion nur fraglich positiven Proben erst in der anschließenden Sequenzierung als sicher positiv herausstellten. Dies ist u.a. auf die zum Teil recht kleinen erwarteten Fragmente zurückzuführen, die nur bei langen Laufzeiten ausreichend separiert werden. Zum anderen werden die Amplifikate nicht immer an beiden Restriktionsorten geschnitten, sodass nicht in jedem Fall an den erwarteten Höhen entsprechende Banden im Gel auftreten. Dennoch diente die Restriktion dazu, eindeutig negative Proben, die in der PCR nicht sicher als solche erfasst werden konnten, herauszufiltern und nicht unnötig einer Sequenzierung zuzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Prävalenzvergleiche mit anderen Studien sind in Anbetracht wechselnder Sensitivität und Spezifität der jeweils angewandten Methoden immer auch unter dem Vorbehalt möglicherweise dadurch bedingter Differenzen in den ermittelten Befallszahlen zu sehen.

6.7 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Prävalenzerfassung verschiedener Pathogene in heimischen *I. ricinus* Zecken sowie der Identifizierung möglicher Reservoirwirte. Die Untersuchung wirtssuchender und an verschiedenen Wirtsspezies parasitierender *I. ricinus* innerhalb ein- und desselben Habitates ist dabei bisher einmalig. Die Resultate zeigen, dass *I. ricinus* als Vektor für *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. im untersuchten Habitat fungiert. Neben diesen Erregern zeigten sich in den untersuchten Zecken darüberhinaus auch Infektionen mit *Borrelia* spp. und *Francisella tularensis*, wobei letztgenannter Erreger erstmals in *I. ricinus* Zecken in Deutschland nachgewiesen werden

konnte (Franke et al. 2010). Dabei wurden Koinfektionen mit unterschiedlichen Kombinationen mehrerer Pathogene bei insgesamt 10,9 % der untersuchten Zecken erfasst (Franke et al. 2010), was deutlich die Durchseuchung heimischer *I. ricinus* mit multiplen Pathogenen und die Interaktion der verschiedenen Transmissionszyklen belegt.

Die Ergebnisse sprechen für die Annahme, dass Kleinsäuger und Vögel ein mögliches Reservoir zumindest für *B. microti* darstellen. Für die transovariell übertragbare Spezies *B. divergens* kann dies aus den vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden. Ebenso scheint *Ap. flavicollis* eine Reservoirfunktion für Anaplasmen übernehmen zu können. Xenodiagnostische Studien mit sterilen Larven sowie Gewebeprobeentnahmen parasitärischer Wirtstiere sind dringend erforderlich, um die Rolle der untersuchten Wirtsspezies als Reservoir für die oben genannten zeckenassoziierten Erreger eindeutig zu klären. Sowohl innerhalb Deutschlands als auch Europas existieren gegenwärtig nur wenige Studien, die die Rolle von Kleinsäufern und Vögeln als Reservoir für verschiedene zeckenassoziierte Pathogene beleuchten (s. Kap. 6.2 - 6.4, S. 79). Kenntnisse darüber, welche Spezies als Reservoir fungieren, wo diese vorkommen und welchen saisonalen oder geographischen Dynamiken sie unterliegen, hilft, die Verbreitung zeckenassoziiierter Pathogene und deren Auftreten in Gebieten, wo die Erreger bisher nicht bekannt waren, zu verstehen und vorherzusagen. Obgleich sich die vorliegende Studie nur auf ein umschriebenes Habitat innerhalb Deutschlands bezieht, können die Beobachtungen auch auf andere europäische Länder übertragen werden, da die untersuchten Kleinsäuger- und Vogelspezies in großer Zahl auch in anderen europäischen Regionen vorkommen. Zusätzliche Studien unter Einbeziehung weiterer potentieller Wirtstiere und einem größeren Beobachtungszeitraum zur Erfassung auch saisonaler Prävalenzschwankungen sollten zur weiteren Risikobewertung folgen.

Die zum Teil hohen Prävalenzen zeckenassoziiierter Pathogene in *I. ricinus* in Europa sowie in Seroprävalenzstudien ermittelte Antikörpertiter im Menschen stehen im Gegensatz zu den bisher verhältnismäßig geringen Fallzahlen klinisch manifester humaner Anaplasiose, Rickettsiose und Babesiose (s. Kap. 6.1.2, S. 77). Dieser Kontrast liegt zum einen in der hohen Zahl klinisch inapparent verlaufender Infektionen begründet, zum anderen werden aufgrund mangelnder ausreichend sensibler und spezifischer diagnostischer Möglichkeiten nicht alle Infektionen tatsächlich erfasst, sodass es sich um unterdiagnostizierte Erkrankungen handelt. Die zunehmende Zahl neuer fraglich zoonotischer Spezies mit noch unbekanntem Pathogenitätspotential erschwert zusätzlich die zuverlässige Erfassung. Die Etablierung neuer molekularbiologischer Standards zur Diagnostik zeckenassoziiierter Erkrankungen ist damit

unabdingbare Voraussetzung für sichere Risikoerfassung und Risikomanagement im Umgang mit zeckenassoziierten Pathogenen. Bisherige diagnostische Verfahren zur Erfassung von durch Zecken übertragenen Erregern umfassen sowohl den direkten als auch den indirekten Erregernachweis. Mikroskopisch gelingt jedoch nicht für alle Pathogene und vor allem in frühen Krankheitsstadien ein sicherer Erregernachweis (Hunfeld et al. 2008). Auch durch automatische elektronische Blutaussstrichanalyse werden nicht alle Infektionen erfasst (Hildebrandt et al. 2008). Verlässlicher sind Antikörpernachweise wie IFA, ELISA oder Immunoblots, wobei spezielle Antikörper oft erst nach mehreren Tagen bis Wochen im Blut nachweisbar sind und Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Pathogenarten auftreten können. Allein serologisch kann jedoch nicht zwischen verschiedenen Spezies differenziert oder der Zeitpunkt der Infektion bestimmt werden (Hunfeld et al. 2008). Dagegen bietet die PCR die Möglichkeit des raschen und sensitiven Erregernachweises und mittels anschließender Sequenzierung gelingt oft eine Speziesidentifikation. Aufgrund der Zunahme sog. „emerging pathogens“ gilt es, bisherige molekularbiologische diagnostische Standards zu erweitern und an das vermehrte Auftreten neuer Stämme wie z.B. *Babesia* sp. EU1 durch entsprechend neue PCR-Protokolle mit spezifischen Zielgenen anzupassen. Gegenwärtig existieren bereits Ansätze für die Entwicklung einer Multiplex-PCR, die zeitgleich mehrere Erreger in einer Probe und somit auch mögliche Koinfektionen erfassen kann (Courtney et al. 2004, Sirigireddy et al. 2006, Tokarz et al. 2009). Zudem könnte die Verwendung einer „Reverse transcription“ (RT)-PCR mit RNA-Sequenzen statt DNA als Target einen sensitiveren Parameter darstellen, um den Erfolg einer antimikrobiellen Therapie zu kontrollieren (Hildebrandt et al. 2008). Neben der Entwicklung möglichst sensitiver, spezifischer und rascher Detektionsmethoden insbesondere auch für Koinfektionen sowie neu auftretende Erregerspezies gilt es, diese möglichst vielen Laboren zugänglich zu machen. Neue Erregerarten als auch -stämme müssen durch entsprechende PCR-Protokolle mit passenden Primern erfasst und hinsichtlich ihrer Pathogenität bewertet werden, um letztlich auch mögliche Risiken und bestehendes Infektionspotential für den Menschen abschätzen zu können. Ebenso ist es unabdingbar, medizinisches Personal und Ärzte für das zunehmende Auftreten und den Umgang mit sog. „emerging pathogens“ zu sensibilisieren. Zudem sollte angesichts steigender Fälle transfusionsassoziiierter Babesiosen ein generelles Screeningverfahren von Blutprodukten auf Babesien etabliert werden. Gerade chronische, asymptomatisch verlaufende Infektionen mit *B. microti* in immunkompetenten Patienten erhöhen das Risiko einer Pathogenverbreitung und gefährden Empfänger von Blutprodukten dieser Spender

(Hildebrandt et al. 2008). Nur ausreichend sensible und spezifische Testverfahren in der Transfusionsmedizin zumindest in Regionen, wo Babesien endemisch vorkommen, können das Risiko teils lebensbedrohlicher Infektionen minimieren (Leiby 2011). Für Europa sind allerdings im Gegensatz zu den USA bislang entsprechende Risiko-gebiete weitgehend unbekannt. Zudem werden Babesien als „moving target“ bezeichnet, d.h. Pathogene mit saisonal und jährlich variierender Prävalenz, sodass entsprechende endemische Studien systematisch, aber auch über größere Zeiträume angelegt sein sollten (Leiby 2011).

Literaturverzeichnis

- Alberdi MP, Walker AR, Urquhart KA. 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. Epidemiol Infect, 124(2):315-323.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV. 2001. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (*Acari: Ixodidae*) collected from migratory birds. J Med Entomol, 38(4):471-474.
- Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol, 29(12): 2838-2842.
- Babes V. 1888. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boeuf. Compt Rend Acad Sci Ser III Sci Vie, 107:692-694.
- Bakken JS, Krueth JK, Lund T, Malkovitch D, Asanovich K, Dumler JS. 1996. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis, 23(1):198.
- Bakken JS, Dumler JS. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis, 31(2):554-560. Bakken JS, Dumler JS. 2006. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. Ann N Y Acad Sci, 1078:236-247.
- Banerjee R, Anguita J, Ross D, Fikrig E. 2000. Infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis prevents the respiratory burst by down-regulating gp91phox. J Immunol, 164(8):3946-3949.
- Barandika JF, Hurtado A, García-Sanmartín J, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL. 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. Vector Borne Zoonotic Dis, 8(6):829-835.
- Barker SC, Murrell A. 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In: Bowman AS, Nuttall P, Hrsg. Ticks Biology, Disease and Control. Erste Aufl. Cambridge: Cambridge University Press, 1-39.
- Baumgarten BU, Rölinghoff M, Bogdan C. 2000. Ehrlichien. Durch Zecken übertragbare Erreger. Dtsch Ärztebl, 38:1857-1863.
- Beck R, Vojta L, Curković S, Mrljak V, Margaletić J, Habrun B. 2011. Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in Central Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis, 11(1):81-83.

- Bella F, Font B, Uriz S, Muñoz T, Espejo E, Traveria J, Serrano JA, Segura F. 1990. Randomized trial of doxycycline versus josamycin for Mediterranean spotted fever. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(5):937-938.
- Belongia EA. 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2(4):265-273.
- Bermann F, Davoust B, Fournier PE, Brisou-Lapointe AV, Brouqui P. 2002. *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophila*) infection in an adult horse in France. *Vet Rec*, 150(25):787-788.
- Bertolotti L, Tomassone L, Tramuta C, Grego E, Amore G, Ambrogi C, Nebbia P, Mannelli A. 2006. *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol*, 43(2):159-165.
- Beugnet F, Marie JL. 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*, 163(4):298-305.
- Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. 1999. Feline granulocytic ehrlichiosis - a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J Small Anim Pract*, 40(1):20-24.
- Bjoersdorff A, Bergström S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B. 2001. *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis*, 7(5):877-879.
- Blanco JR, Oteo JA. 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 8(12):763-772.
- Blanco JR, Oteo JA. 2006. Rickettsiosis in Europe. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:26-33.
- Blaschitz M, Narodslavsky-Gföller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J. 2008. *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol*, 74(15):4841-4846.
- Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. 2007. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*, 13(8):1208-1210.
- Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N, Hornok S, Honegger H, Hegglin D, Wölfel R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2009. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl Environ Microbiol*, 75(10):3230-3237.
- Borjesson DL, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Argue CM, DeLeo FR. 2005. Insight into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails

- to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J Immunol*, 174:6364-6372.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 9(1):63-70.
 - Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D. 2007. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49(1):2-12.
 - Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikihisa Y, Unver A, Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N, Storch GA. 1999. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med*, 341(3):148-155.
 - Burgdorfer W, Friedhoff KT, Lancaster JL. 1966. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. *Bull World Health Organ*, 35(2):149-153.
 - Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. 1979. *Ixodes ricinus* vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop*, 36(4):357-367.
 - Carlyon JA, Abdel-Latif D, Pypaert M, Lacy P, Fikrig E. 2004. *Anaplasma phagocytophilum* utilizes multiple host evasion mechanisms to thwart NADPH oxidase-mediated killing during neutrophil infection. *Infect Immun*, 72(8):4772-4783.
 - Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC. 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*, 13(1):65-70.
 - Cascio A, Colomba C, Antinori S, Paterson DL, Titone L. 2002. Clarithromycin versus azithromycin in the treatment of Mediterranean spotted fever in children: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*, 34(2):154-158.
 - Cascio A, Di Liberto C, D'Angelo M, Iaria C, Scarlata F, Titone L, Campisi G. 2004. No findings of dental defects in children treated with minocycline. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7):2739-2741.
 - Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*, 32(3):589-595.

- Christova I, Schouls L, van De Pol I, Park J, Panayotov S, Lefterova V, Kantardjiev V, Dumler JS. 2001. High prevalence of granulocytic ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. J Clin Microbiol, 39(11):4172-4174.
- Christova I, Gladnishka T. 2005. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. Ann Agric Environ Med, 12(1):149-152.
- Connor, A, Bruch A. 1910. Une fièvre éruptive observée en Tunisie. Bull Soc Pathol Exot Fil, 8:492-496.
- Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford SR 3rd, Herwaldt BL. 2006. Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: *Babesiidae*) from humans and its differentiation from other piroplasms. Int J Parasitol, 36 (7):779-789.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol, 42 (7):3164-3168.
- Daniels TJ, Battaly GR, Liveris D, Falco RC, Schwartz I. 2002. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? Emerg Infect Dis, 8(12):1524-1525.
- Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O. 2008. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. Int J Med Microbiol, 298 Suppl 1, 50-54.
- de la Fuente J, Ruiz-Fons F, Naranjo V, Torina A, Rodríguez O, Gortázar C. 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. Res Vet Sci, 84(3):382-386.
- Derdáková M, Halanová M, Stanko M, Štefančíková A, Čisláková L, Pet'ko B. 2003. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med, 10(2):269-271.
- Dizij A, Kurtenbach K. 1995. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. Parasite Immunol, 17(4):177-183.
- Dobler G, Wölfel R. 2009. Fleckfieber und andere Rickettsiosen: Alte und neu auftretende Infektionen in Deutschland. Dtsch Ärztebl Int, 106(20):348-354.
- Donatien A, Lestoquard F. 1935. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. Bull Soc Pathol Exot, 28: 418-419.

- Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P. 2010. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet Parasitol*, 167(2-4):149-154.
- Dubska L, Literak I, Kocianova E, Taragelová V, Sychra O. 2009. Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*, 75(3):596-602.
- Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. 2001. Diversity of *Babesia* infecting european sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol*, 39(9):3395-3397.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt6):2145-2165.
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*, 11:1828-1834.
- Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. 2007. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*, 45 Suppl 1:45-51.
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P, Hrsg. 2008. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Zweite vollständig überarbeitete Aufl. Stuttgart: Enke Verlag.
- Eisen L, Lane RS. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G, Hrsg. *Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control*. Erste Aufl. New York: CABI Publishing, 91-115.
- Elfving K, Olsen B, Bergström S, Waldenström J, Lundkvist A, Sjöstedt A, Mejlon H, Nilsson K. 2010. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in europe by migrating birds. *PLoS One*, 5(1):e8572.
- Estrada-Peña A, Osácar JJ, Pichon B, Gray JS. 2005. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Exp Appl Acarol*, 37(3-4):257-268.
- Evenson DA, Perry E, Kloster B, Hurley R, Stroncek DF. 1998. Therapeutic apheresis for babesiosis. *J Clin Apher*, 13(1):32-36.

- Falagas ME, Klempner MS. 1996. Babesiosis in patients with AIDS: a chronic infection presenting as fever of unknown origin. Clin Infect Dis, 22(5):809-812.
- Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG und Wilske B. 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: Increased seroprevalence in high-risk groups. J Clin Microbiol, 35(12):3244-3247.
- Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B. 1999. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. Med Microbiol Immunol, 188(3):145-149.
- Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brand B, Telford SR 3rd. 2002. Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. Emerg Infect Dis, 8(7):722-726.
- Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. Emerg Infect Dis, 6(4):389-392.
- Franca C. 1912. Sur la classification des piroplasmes et description de deux formes de ces parasites. Arch Inst Bacteriol Cam Pest, 3:11-18.
- Franke J. 2010. Zur Bedeutung des Vektors *Ixodes ricinus* und verschiedener Wirtsspezies für die Verbreitung zeckenassoziiierter Krankheitserreger [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Franke J, Fritsch J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010. Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. Appl Environ Microbiol, 76(20):6829-6836.
- Gatter W. 2000. Vogelzug und Vogelbestände in Mitteleuropa: 30 Jahre Beobachtung des Tagzugs am Randecker Maar. Erste Aufl. Wiebelsheim: Aula-Verlag.
- Goddard J. 2003. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. J Med Entomol, 40(5):686-689.
- Goethert HK, Telford SR 3rd. 2003. What is *Babesia microti*? Parasitology, 127:301-309.
- Gray JS, von Stedingk LV, Gürtelschmid M, Granström M. 2002. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. J Clin Microbiol, 40(4):1259-1263.

- Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 593232. Epub 2009 Jan 4.
- Gray J, Zintl A, Hildebrandt A, Hunfeld KP, Weiss L. 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick-borne Dis*, 1(1):3-10.
- Gunders AE. 1977. Piroplasmal sporozoites in the argasid *Ornithodoros erraticus* (Lucas). *Experientia*, 33(7):892-893.
- Haapasalo K, Suomalainen P, Sukura A, Siikamaki H, Jokiranta TS. 2010. Fatal babesiosis in man, Finland, 2004. *Emerg Infect Dis*, 16(7):1116-1118.
- Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. 2005. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res*, 36(1):79-87.
- Harrus S, Baneth G. 2005. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int J Parasitol*, 35(11-12):1309-1318.
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37:86-92.
- Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P. 2008. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol Res*, 103 Suppl 1:109-116.
- Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld KP. 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol*, 297(3):197-204.
- Hayes SF, Burgdorfer W, Aeschlimann A. 1980. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: Detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect Immun*, 27(2):638-642.
- Hellenbrand W, Poggensee G. 2007. Zecken auf dem Vormarsch: Borreliose und FSME im Gepäck. *Berliner Ärzte*, 44(5):14-21.
- Herron MJ, Nelson CM, Larson J, Snapp KR, Kansas GS, Goodman JL. 2000. Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science*, 288(5471):1653-1656.

- Hermanowska-Szpakowicz T, Skotarczak B, Kondrusik M, Rymaszewska A, Sawczuk M, Maciejewska A, Adamska M, Pancewicz S, Zajkowska J. 2004. Detecting DNAs of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*, 11(2):351-354.
- Herwaldt BL, Caccio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Löschenberger K, Tura S, Pieniazek NJ. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*, 9(8):942-948.
- Herwaldt BL, de Bruyn G, Pieniazek NJ, Homer M, Lofy KH, Slemenda SB, Fritsche TR, Persing DH, Limaye AP. 2004. *Babesia divergens*-like infection, Washington State. *Emerg Infect Dis*, 10(4):622-629.
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E. 2002. Prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. *FEMS Microbiol Lett*, 211(2):225-230.
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(6):364-367.
- Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehnopf M, Fricke HJ, Straube E. 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26(8):595-601.
- Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld KP. 2008. Human babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? *Int J Med Microbiol*, 298 Suppl 1:336-346.
- Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2010a. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick-borne Dis*, 1(2):105-107.
- Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E. 2010b. Detection of *Rickettsia* spp. And coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick-borne Dis*, 1(1):52-56.
- Hildebrandt A, Fritsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2011. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:533-537.

- Hillyard PD. 1996. Ticks of North-West Europe. No.52. Dorchester: The Dorset Press.
- Hilton E, DeVoti J, Benach JL, Halluska ML, White DJ, Paxton H, Dumler JS. 1999. Seroprevalence and seroconversion for tick-borne diseases in a high-risk population in the northeast United States. *Am J Med*, 106(4):404-409.
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, Krause PJ, Persing DH. 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 13:451-469.
- Hornok S, Meli ML, Perreten A, Farkas R, Willi B, Beugnet F, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2009. Molecular investigation of hard ticks (*Acari: Ixodidae*) and fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet Microbiol*, 140(1-2):98-104.
- Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Agüero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, Wong SJ, Chu F, Liveris D, Schwartz I. 1998. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*, 339(6):375-378.
- Hubálek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis*, 40(4):639-659.
- Humair PF, Rais O, Gern L. 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology*, 118 (Pt 1):33-42.
- Hunfeld KP, Brade V. 1999. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18(3):221-224.
- Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM. 2002. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol*, 40(7):2431-2436.
- Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. 2008. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int J. Parasitol*, 38(11):1219-1237.
- Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A, Papadopoulos B, Tselentis Y, Psaroulaki A. 2009. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:158-160.
- Jado I, Oteo JA, Aldámiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, Garcia-Amil C, Rodríguez-Moreno I, Anda P. 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis*, 13(9):1405-1407.

- Jahnson M, Hrsg. 2007. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Vierte Aufl. München: Spektrum akademischer Verlag.
- Jansen A, La Scola B, Raoult D, Lierz M, Wichmann O, Stark K, Schneider T. 2008. Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. *Emerg Infect Dis*, 14(12):1961-1963.
- Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J, Beelitz P, Pfister K, Nolte I. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health*, 54(2):94-101.
- Kahl O, Knülle W. 1988. Wirtssuchaktivität der Schildzecke *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) und ihre Durchseuchung mit Lyme-Spirochäten und dem Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus in Berlin (West). *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent*, 6:223-225.
- Kahl O. 1994. Die Zecke als Vektor. In: Süss J, Hrsg. Durch Zecken übertragbare Erkrankungen: FSME und Lyme-Borreliose. 2. Potsdamer Symposium. Schriesheim: Weller:1-19.
- Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R. 1998. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl Bakteriol*, 287(1-2):41-52.
- Kálmán D, Sréter T, Széll Z, Egyed L. 2003. *Babesia microti* infection of anthropophilic ticks (*Ixodes ricinus*) in Hungary. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(3):317-319.
- Kantsø B, Svendsen CB, Jensen PM, Vennestrøm J, Krogfelt KA. 2010. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. *Ticks Tick-borne Dis*, 1(2):101-103.
- Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SR 3rd. 1998. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis*, 177(5), 1422-1425.
- Kaufman WR. 2010. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks Tickborne Dis*, 1(1):11-22.
- Keirans JE. 2009. Order Ixodida. In: Krantz GW, Walter DE, Hrsg. A manual of acarology. 3. Aufl. Lubbock: Texas Tech University Press, 111-123.

- Kelly PJ, Mason PR. 1991. Transmission of a spotted fever group rickettsia by *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol, 28(5):598-600
- Kipp S. 2008. Wirt-Vektor-Beziehungen und genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Borreliose Naturherden [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Kjemtrup AM, Conrad PA. 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. Int J Parasitol, 30(12-13):1323-1337.
- Koči J, Movila A, Taragel'ová V, Toderas I, Uspenskaia I, Derdákova M, Labudá M. 2007. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. Exp Appl Acarol, 41(1-2):147-152.
- Krause PJ, Spielman A, Telford SR 3rd, Sikand VK, McKay K, Christianson D, Pollack RJ, Brassard P, Magera J, Ryan R, Persing DH. 1998. Persistent parasitemia after acute babesiosis. N Engl J Med, 339(3):160-165.
- Krause PJ, Lepore T, Sikand VK, Gadbaw J Jr, Burke G, Telford SR 3rd, Brassard P, Pearl D, Azlanzadeh J, Christianson D, McGrath D, Spielman A. 2000. Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. N Engl J Med, 343(20):1454-1458.
- Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, Closter L, Christianson D, Telford SR, Persing D, Radolf JD, Spielman A. 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. Clin Infect Dis, 34(9):1184-1191.
- Kurtenbach K, Kampen H, Dizij A, Arndt S, Seitz HM, Schaible UE, Simon MM. 1995. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. J Med Entomol, 32(6):807-817.
- Kuzna-Grygiel W, Bukowska K, Cichocka A, Kosik-Bogacka D, Skotarczak B. 2002. The prevalence of piroplasms in a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from northwestern Poland. Ann Agric Environ Med, 9(2):175-178.
- Ladbury GA, Stuen S, Thomas R, Bown KJ, Woldehiwet Z, Granquist EG, Bergstrom K, Birtles RJ. 2008. Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. J Clin Microbiol, 46(5):1686-1691.

- Lawrie CH, Nuttall PA. 2001. Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. *Parasite Immunol*, 23(10):549-556.
- Leiby DA. 2011. Transfusion-transmitted *Babesia* spp.: bull's-eye on *Babesia microti*. *Clin Microbiol Rev*, 24(1):14-28.
- Liebisch A, Liebisch G. 1997. Biologie und Ökologie der Zecken. In: Horst H. Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. Dritte überarbeitete Aufl. Balingen: Demeter-Verlag im Spitta Verlag, 31-47.
- Lindgren E, Tälleklint L, Polfeldt T. 2000. Impact of climate change on northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect*, 108(2):119-123.
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol*, 38(3):1002-1007.
- Lottspeich F. 2006. Bioanalytik. Zweite Aufl. München: Spektrum akademischer Verlag.
- Machtinger L, Telford SR 3rd, Inducil C. 1993. Treatment of babesiosis by red blood cell exchange in an HIV-positive, splenectomized patient. *J Clin Apher*, 8(2):78-81.
- Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic *Rickettsia*. *N Engl J Med*, 316(14):853-856.
- Magnarelli LA, Bushmich SL, IJdo JW, Fikrig E. 2005. Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. *Am J Vet Res*, 66(11):1895-1899.
- Mannelli A, Nebbia P, Tramuta C, Grego E, Tomassone L, Ainardi R, Venturini L, De Meneghi D, Meneguz PG. 2005. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) feeding on blackbirds in northwestern Italy. *J Med Entomol*, 42(2):168-175.
- Márquez FJ. 2008. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol*, 45(3-4):185-194.
- Martinot M, Zadeh MM, Hansmann Y, Grawey I, Christmann D, Aguilon S, Jouglin M, Chauvin A, De Briel D. 2011. Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. *Emerg Infect Dis*, 17(1):114-116.

- Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J Clin Microbiol, 36(4):1090-1095.
- Messerer, S. 2006. Entwicklung und Evaluierung von Real-time PCR-Verfahren zum Nachweis von *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmataceae). [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- M'Fadyean J, Stockman S. 1911. A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. J Comp Pathol, 24:340-354.
- Michalik J, Wodecka B, Skoracki M, Sikora B, Stańczyk J. 2008. Prevalence of avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). Int J Med Microbiol, 298 Suppl 1:129-138.
- Milutinović M, Masuzawa T, Tomanović S, Radulović Z, Fukui T, Okamoto Y. 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. Exp Appl Acarol, 45(3-4):171-183.
- Mott J, Barnewall RE, Rikihisa Y. 1999. Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. Infect Immun, 67(3):1368-1378.
- Movila A, Reye AL, Dubinina HV, Tolstenkov OO, Toderas I, Hübschen JM, Muller CP, Alekseev AN. 2011. Detection of *Babesia* sp. EU1 and members of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia. Vector Borne Zoonotic Dis, 11:89-91.
- Mullis KB, Faloona F. 1987. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 155:335-350.
- Nilsson A, Lundqvist L. 1978. Host selection and movements of *Ixodes ricinus* (Acari) larvae on small mammals. Oikos, 31:313-322.
- Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TG, Friman G, Pahlson C. 1999. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. J Clin Microbiol, 37(2):400-403.
- Nilsson K, Lukinius A, Pahlson C, Moron C, Hajem N, Olsson B, Lindquist O. 2005. Evidence of *Rickettsia* spp. infection in Sweden: a clinical, ultrastructural and serological study. APMIS, 113(2), 126-134.

- Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P. 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int J Med Microbiol*, 291 Suppl 33:22-29.
- Ogden NH, Casey ANJ, Woldehiwet Z, French NP. 2003. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infect Immun*, 71(4):2071-2078.
- Ogden NH, Lindsay LR, Hanincová K, Barker IK, Bigras-Poulin M, Charron DF, Heagy A, Francis CM, O'Callaghan CJ, Schwartz I, Thompson RA. 2008. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol*, 74(6):1780-1790.
- Oporto B, Gil H, Barral M, Hurtado A, Juste RA, Garcia-Perez AL. 2003. A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain. *Ann N Y Acad Sci*, 990:98-102.
- Oster CN, Burke DS, Kenyon RH, Ascher MS, Harber P, Pedersen CE. 1977. Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. *N Engl J Med*, 297(16):859-863.
- Park J, Choi KS, Dumler JS. 2003. Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect Immun*, 71(7):4018-4025.
- Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*, 32(6):897-928.
- Parola P, Davoust B, Raoult D. 2005a. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*, 36(3):469-492.
- Parola P, Paddock CD, Raoult D. 2005b. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18(4):719-756.
- Paulauskas A, Radzijeuskaja J, Rosef O. 2009. *Anaplasma* in ticks feeding on migrating birds and questing ticks in Lithuania and Norway. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:34-36.
- Pauliks K. 2009. Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus*-Zecken im Naherholungsgebiet Zeitzgrund in Thüringen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Peirce MA. 2005. A checklist of the valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: *Piroplasmorida*), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: *Haemosporida*), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: *Haemogregarinidae*). *J Natural History* 39(42):3621-3632.

- Petrovec M, Lotric Furlan S, Avsic Zupanc T, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS. 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol, 35(6):1556-1559.
- Philip CB, Parker RR. 1933. Rocky Mountain spotted fever. Investigation of sexual transmission in the wood tick *Dermacentor andersoni*. Public Health Rep, 48:266-272.
- Piccolin G, Benedetti G, Doglioni C, Lorenzato C, Mancuso S, Papa N, Pitton L, Ramon MC, Zasio C, Bertiato G. 2006. A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. Vector Borne Zoonotic Dis, 6(1):24-31.
- Pichon B, Rogers M, Egan D, Gray J. 2005. Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. Vector Borne Zoonotic Dis, 5(2):172-180.
- Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS. 2006. Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. Vector Borne Zoonotic Dis, 6(4):382-387.
- Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J Med Microbiol, 47(3):235-251.
- Pretzmann G, Radda A, Loew H. 1964. Studien zur Ökologie von *Ixodes ricinus* L. in einem Endemiegebiet der Frühsommermeningoencephalitis (FSME) im Bezirk Neunkirchen (Niederösterreich) Z. Morph. Ökol Tiere, 54:393-413.
- Pusterla N, Weber R, Wolfensberger C, Schär G, Zbinden R, Fierz W, Madigan JE, Dumler JS, Lutz H. 1998. Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 17(3):207-209.
- Radzijeuskaja J, Paulauskas A, Rosef O. 2008. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks from Lithuania and Norway. Int J Med Microbiol, 298 Suppl 1:218-221.
- Randolph SE. 2000. Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. Adv Parasitol, 47:217-243.
- Randolph SE. 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 356(1411):1045-1056.

- Raoult D, Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev, 10:694-719.
- Rehacek J. 1984. *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology. Acta Sci Nat Brno, 18:1-50.
- Reis C, Cote M, Paul RE, Bonnet S. 2011. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. Vector Borne Zoonotic Dis, 11(7):907-916.
- Reisen WK. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. Annu Rev Entomol, 55:461-483.
- Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Muller CP. 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. Appl Environ Microbiol, 76(9):2923-2931.
- Ribeiro, JM. 1987. Role of saliva in blood-feeding arthropods. Annu Rev Entomol, 32:463-478.
- Ricketts HT. 1906. The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood tick (*Dermacentor occidentalis*). JAMA, 47(5):358.
- Ricketts HT. 1909. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. Med. Rec, 76:843-855.
- Rikihisa Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev, 4(3):286-308.
- Robert-Koch-Institut. 2006. Steckbriefe seltener und importierter bakterieller Erkrankungen: Babesiose. 110.
- Robert-Koch-Institut. 2007. Ein möglicher Vektor: Auwaldzecke – *Dermacentor reticulatus*. Epidemiologisches Bulletin 14:117-118.
- Robert-Koch-Institut. 2009. *Dermacentor reticulatus* (Auwaldzecke): Bedeutung als potenzieller Überträger von Erregern auf den Menschen. Epidemiologisches Bulletin 29:275.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T. 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie. Fünfte vollständig neubearbeitete Aufl. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J. 2009a. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. Acta Vet Scand, 51:47.

- Rosef O, Radzijeuskaja J, Paulauskas A, Haslekås C. 2009b. The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Norway. Clin Microbiol Infect, 15 Suppl 2:43-45.
- Roux V, Raoult D. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). Int J Syst Evol Microbiol, 50 Pt 4:1449-1455.
- Rudakov N, Samoilenko I, Yakimemko VV, Reshetnikova TA, Shpynov S, Walker DH, Tankibaev M. 1999. The re-emergence of Siberian tick typhus: field and experimental observations. In: Raoult D, Brouqui P, Hrsg. Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium. Paris: Elsevier, 269-273.
- Saito-Ito A, Tsuji M, Wei Q, He S, Matsui T, Kohsaki M, Arai S, Kamiyama T, Hioki K, Ishihara C. 2000. Transfusion-acquired, autochthonous human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites with hu-RBC-SCID mice. J Clin Microbiol, 38(12):4511-4516.
- Saito-Ito A, Yano Y, Dantrakool A, Hashimoto T, Takada N. 2004. Survey of rodents and ticks in human babesiosis emergence area in Japan: first detection of *Babesia microti*-like parasites in *Ixodes ovatus*. J Clin Microbiol, 42(5):2268-2270.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Dritte Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci, 74(12):5463-5467.
- Santos-Silva MM, Sousa R, Santos AS, Melo P, Encarnação V, Bacellar F. 2006. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. Exp Appl Acarol, 39(3-4):331-338.
- Schex S, Dobler G, Riehm J, Müller J, Essbauer S. 2011. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in lower bavaria, South-Eastern Germany. Vector Borne Zoonotic Dis, 55(5):493-502.
- Schriefer ME, Azad AF. 1994. Changing ecology of Rocky Mountain spotted fever. In: Sonenshine DE, Mather TN, Hrsg. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. New York: Oxford University Press, 314-326.
- Shih CM, Liu LP, Chung WC, Ong SJ, Wang CC. 1997. Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. J Clin Microbiol, 35(2):450-454.

- Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K. 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. Emerg Infect Dis, 14(6):972-974.
- Siński E, Bajer A, Welc R, Pawełczyk A, Ogrzewalska M, Behnke JM. 2006a. *Babesia microti*: Prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of northeastern Poland. Int J Med Microbiol, 296 Suppl 1:137-143.
- Siński E, Pawełczyk A, Bajer A, Behnke J. 2006b. Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. Ann Agric Environ Med, 13(2):295-300.
- Sirigireddy KR, Mock DC, Ganta RR. 2006. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* pathogens in vertebrate and tick hosts by real-time RT-PCR. Ann N Y Acad Sci, 1078:552-556.
- Skarphéðinsson S, Lyholm BF, Ljungberg M, Sogaard P, Kolmos HJ, Nielsen LP. 2007. Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. APMIS, 115(3):225-230.
- Skoracki M, Michalik J, Skotarczak B, Rymaszewska A, Sikora B, Hofman T, Wodecka B, Sawczuk M. 2006. First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: *Syringophilidae*) parasitizing passerine birds. Microbes Infect, 8(2):303-307.
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. J Parasitol, 89(1):194-196.
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M, Adamska M, Maciejewska A. 2006. PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. Ann Agric Environ Med, 13(1):21-23.
- Skrabalo Z, Deanovic Z. 1957. Piroplasmosis in man: report of a case. Doc Med Geogr Trop, 9(1):11-16.
- Smith T, Kilbourne FL. 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern cattle tick fever. U.S. Dep Agr Bur Ani Ind Bull, 1:177-304.
- Sonenshine DE. 1991a. Biology of ticks Volume 1. Erste Aufl. New York, Oxford: Oxford University Press.
- Sonenshine DE. 1991b. Biology of ticks Volume 2. Erste Aufl. New York, Oxford: Oxford University Press.

- Spitalská E, Literak I, Sparagano OA, Golovchenko M, Kocianová E. 2006. Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien Klin Wochenschr*, 118(23-24):759-764.
- Spitalská E, Boldis V, Kostanova Z, Kocianová E, Stefanidesová K. 2008. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol*, 52(3):175-179.
- Stańczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med*, 11(1):109-114.
- Stańczak J. 2006. The occurrence of spotted fever group (SFG) *Rickettsiae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in northern Poland. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:512-514.
- Stańczak J, Racewicz M, Michalik J, Buczek A. 2008. Distribution of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* tick populations in Poland. *Int J Med Microbiol*, 298 Suppl 1:231-234.
- Stańczak J, Racewicz M, Cieniuch S, Michalik J, Sikora B. 2009. Prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) parasitizing small rodents. Proceedings of the X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases in Weimar, page 71.
- Stanek G. 2009. Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. *Wien Klin Wochenschr*, 121:673-683.
- Štefančíková A, Derdáková M, Lenčáková D, Ivanová R, Stanko M, Čisláková L, Petko B. 2008. Serological and molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* in rodents. *Folia Microbiol (Praha)*, 53(6):493-499.
- Stern C, Kaiser A, Maier WA, Kampen H. 2006. Die Rolle von Amsel (*Turdus merula*), Rotdrossel (*Turdus iliacus*) und Singdrossel (*Turdus philomelos*) als Blutwirte für Zecken (Acari: Ixodidae) und Reservoirwirte für vier Genospezies des *Borrelia burgdorferi*- Artenkomplexes. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent*, 15:349-356.
- Strle F. 2004. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37:27-35.
- Sudfeldt C, Dröschmeister R, Grüneberg C, Jaehne S, Mitschke A, Wahl J. 2008. Vögel in Deutschland 2008. DDA, BfN, LAG VSW, Münster.

- Süss J, Schrader C. 2004. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. Teil I: Zecken und Viren. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 47(4):392-404.
- Süss J, Fingerle V, Hunfeld KP, Schrader C, Wilske B. 2004. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. Teil II: Bakterien, Parasiten und Mischinfektionen. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 47(4):470-486.
- Süss J. 2007. Zecken: Was man über FSME und Borreliose wissen muss. Erste Aufl. Kreuzlingen, München: Heinrich Hugendubel Verlag.
- Süss J, Klaus C, Gerstengarbe FW, Werner PC. 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. J Travel Med, 15(1):39-45.
- Svendsen CB, Krogfelt KA, Jensen PM. 2009. Detection of *Rickettsia* spp. in Danish ticks (*Acari: Ixodes ricinus*) using real-time PCR. Scand J Infect Dis, 41(1):70-72.
- Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. 2006. Coinfections acquired from *ixodes* ticks. Clin Microbiol Rev, 19(4):708-727.
- Tälleklint L, Jaenson TG. 1994. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s. l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. J Med Entomol, 31(6):880-886.
- Tälleklint L, Jaenson TG. 1995. Is the small mammal (*Clethrionomys glareolus*) or the tick vector (*Ixodes ricinus*) the primary overwintering reservoir for the Lyme borreliosis spirochete in Sweden? J Wildl Dis, 31(4):537-540.
- Tokarz R, Kapoor V, Samuel JE, Bouyer DH, Briese T, Lipkin WI. 2009. Detection of tick-borne pathogens by MassTag polymerase chain reaction. Vector Borne Zoonotic Dis, 9(2):147-152.
- Uilenberg G. 2006. *Babesia* - a historical overview. Vet Parasitol, 138(1-2):3-10.
- Vannier E, Krause PJ. 2009. Update on babesiosis. Interdiscip Perspect Infect Dis, 984568.
- Walker DH. 2000. Diagnosing human ehrlichioses: current status and recommendations. Am Soc Microbiol News, 66:287-290.
- Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. 2003. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. Ann N Y Acad Sci, 990:1-11.
- Wall R, Shearer D. 2001. Ticks (Acari). In: Wall R, Shearer D. Veterinary Ectoparasites Biology, pathology & control. Zweite Aufl. Blackwell Science, 55-82.

- Walter G, Weber G. 1981. A study on the transmission (transstadial, transovarial) of *Babesia microti*, strain “Hannover i”, in its tick vector, *Ixodes ricinus*. Tropenmed Parasitol, 32(4):228-230.
- Wang T, Malawista SE, Pal U, Grey M, Meek J, Akkoyunlu M, Thomas V, Fikrig E. 2002. Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. J Infect Dis, 186(2):274-280.
- Webster P, IJdo JW, Chicoine LM, Fikrig E. 1998. The agent of human granulocytic ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. J Clin Invest, 101(9):1932-1941.
- Welc- Fałęciak R, Behnke JM, Siński E. 2008. Effects of host diversity and the community composition of hard ticks (Ixodidae) on *Babesia microti* infection. Int J Med Microbiol, 298 Suppl 1:235-242.
- Wells GM, Woodward TE, Fiset P, Hornick RB. 1978. Rocky Mountain spotted fever caused by blood transfusion. JAMA, 239(26):2763-2765.
- Western KA, Benson GD, Gleason NN, Healy GR, Schultz MG. 1970. Babesiosis in a Massachusetts resident. N Engl J Med, 283(16):854-856.
- Wójcik-Fatla A, Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwolinski J, Buczek A, Dutkiewicz J. 2006. Prevalence of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). Ann Agric Environ Med, 13(2):319-322.
- Wójcik-Fatla A, Szymanska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J. 2009. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. Ann Agric Environ Med, 16(1):151-158.
- Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G. 2006. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. Ann N Y Acad Sci, 1078:509-511.
- Yoshiie K, Kim HY, Mott J, Rikihisa Y. 2000. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. Infect Immun 68(3):1125-1133.
- Zhan L, Cao WC, Chu CY, Jiang BG, Zhang F, Liu W, Dumler JS, Wu XM, Zuo SQ, Zhang PH, Huang HN, Zhao QM, Jia N, Yang H, Richardus JH, Habbema JD. 2009. Tick-borne agents in rodents, China, 2004-2006. Emerg Infect Dis, 15(12):1904-1908.

- Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev, 16(4):622-636.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	26
Tab. 2 Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Enzyme.	27
Tab. 3 Herstellung des TAE-Puffers.	27
Tab. 4 Herstellung des Ladepuffers Orange G.....	28
Tab. 5 Pipettierschema für den PCR-Ansatz.....	32
Tab. 6 Erregerabhängige PCR-Bedingungen im Thermocycler.	33
Tab. 7 Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR zum Nachweis von <i>A. phagocytophilum</i>	33
Tab. 8 Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR zum Nachweis von <i>Rickettsia</i> spp...	34
Tab. 9 Sequenzen der verwendeten Primer für die PCR zum Nachweis von <i>Babesia</i> spp.....	35
Tab. 10 Erregerspezifisches Pipettierschema für den Restriktionsansatz.	38
Tab. 11 <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> spp.: Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>SspI</i>	38
Tab. 12 <i>Babesia</i> spp.: Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>AluI</i>	39
Tab. 13 Pipettierschema für den PCR-Ansatz zur Sequenzierung.....	40
Tab. 14 Sequenzierung: PCR- Bedingungen im Thermocycler.	40
Tab. 15 DNA-Gehalt der untersuchten Zecken nach Entwicklungsstadium.	43
Tab. 16 Überblick über die Artenverteilung und Infestationszahlen mit <i>I. ricinus</i> der in Reifenstein gefangenen Vögel.....	51
Tab. 17 Infestationszahlen der untersuchten Vögel in Abhängigkeit von der Jahreszeit.....	52
Tab. 18 Prävalenzen von <i>A. phagocytophilum</i> in <i>I. ricinus</i> von Vögeln.....	53
Tab. 19 Prävalenzen von <i>Rickettsia</i> spp. in von Vögeln stammenden <i>I. ricinus</i> Zecken.....	54
Tab. 20 Prävalenzen von <i>Babesia</i> spp. in von Vögeln stammenden <i>I. ricinus</i>	55
Tab. 21 Überblick über den Ursprung und die Stadienverteilung der untersuchten <i>I. ricinus</i> Zecken von Kleinsäugetern aus Reifenstein.	56

Tab. 22 Prävalenz von <i>A. phagocytophilum</i> in an Kleinsäugetern parasitierenden Zecken aus Reifenstein.	58
Tab. 23 Prävalenz von <i>Rickettsia</i> spp. in <i>I. ricinus</i> von Kleinsäugetern aus Reifenstein.	59
Tab. 24 Prävalenz von <i>Babesia</i> spp. in Zecken von Kleinsäugetern im Untersuchungsgebiet Reifenstein.....	61
Tab. 25 Koinfektionen in <i>I. ricinus</i> unterschiedlichen Ursprungs aus Reifenstein.....	63
Tab. 26 Koinfektionen borreliensinfizierter <i>I. ricinus</i> unterschiedlichen Ursprungs aus Reifenstein.....	64
Tab. 27 Wirtstiere mit Infestation mit von mehreren Pathogenen befallenen Zecken.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die Entwicklungsstadien von <i>I. ricinus</i> .	4
Abb. 2 Der dreiwirtige Entwicklungszyklus von <i>I. ricinus</i> .	7
Abb. 3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> in einem neutrophilen Granulozyten.	11
Abb. 4 Der Entwicklungszyklus von <i>Babesia</i> spp.	19
Abb. 5 Giemsa gefärbter Blutaussstrich eines Hamsters.	22
Abb. 6 Fanggebiete Reifenstein, Gemeinde Kleinbartloff/ Thüringen.	28
Abb. 7 Fangfläche Klärteich (a) und Schafsteich (b) in Reifenstein.	29
Abb. 8 Partialsequenz des 16S rRNA Gens von <i>A. phagocytophilum</i> .	34
Abb. 9 Partialsequenz des Zitratsynthasegens <i>gltA</i> von <i>R. helvetica</i> .	35
Abb. 10 Partialsequenz des 18S rRNA Gens von <i>B. microti</i> .	36
Abb. 11 Chromatogramm mit Auszug aus der 18S rDNA Sequenz von <i>B. microti</i> .	41
Abb. 12 Boxplotdiagramm des DNA-Gehalts der untersuchten <i>I. ricinus</i> Zecken.	43
Abb. 13 Prävalenzen von <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> spp. und <i>Babesia</i> spp. in <i>I. ricinus</i> Zecken aus Reifenstein.	44
Abb. 14 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation des 16S rRNA Gens von <i>A. phagocytophilum</i> .	45
Abb. 15 Flußdiagramm zur Bestimmung von <i>A. phagocytophilum</i> in <i>I. ricinus</i> Zecken.	46
Abb. 16 Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus dem Restriktionsverdau mit dem Enzym <i>SspI</i> .	46
Abb. 17 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation des Zitratsynthasegens <i>gltA</i> von <i>Rickettsia</i> spp.	47
Abb. 18 Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsprodukte aus dem Verdau mit <i>SspI</i> .	48
Abb. 19 Flußdiagramm zur Bestimmung von <i>Rickettsia</i> spp. in <i>I. ricinus</i> Zecken.	48
Abb. 20 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation des 18S rRNA Gens zum Nachweis von <i>Babesia</i> spp.	49

Abb. 21 Flußdiagramm zur Bestimmung von <i>Babesia</i> spp. in <i>I. ricinus</i> Zecken.	49
Abb. 22 Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus dem Restriktionsverdau mit dem Enzym <i>AluI</i>	50
Abb. 23 Boxplotdiagramm der Infestationsraten von Kleinsäugetieren mit <i>I. ricinus</i>	57
Abb. 24 Durchschnittliche Infestation der Kleinsäugetierarten mit <i>I. ricinus</i> in Abhängigkeit von der Jahreszeit.	58
Abb. 25 Prävalenzen der untersuchten Erreger in <i>I. ricinus</i> Zecken unterschiedlichen Ursprungs.	66
Abb. 26 Anteil detektierter Infektionen in <i>I. ricinus</i> in Abhängigkeit des Zeckenursprungs- und des Stadiums.	68
Abb. 27 Anteil detektierter Infektionen in <i>I. ricinus</i> in Abhängigkeit des Zeckenursprungs und der Jahreszeit.	69
Abb. 28 Prävalenzen der untersuchten Erregerspezies in von Vögeln stammenden <i>I. ricinus</i> aus Reifenstein in den drei unterschiedlichen Fangperioden.	70
Abb. 29 Prävalenzen der untersuchten Erregerspezies in wirtssuchenden Zecken aus Reifenstein zu unterschiedlichen Fangperioden.	71
Abb. 30 Prävalenzen der drei untersuchten Erregerspezies in von Kleinsäugetieren stammenden <i>I. ricinus</i> Zecken aus Reifenstein in den drei verschiedenen Fangperioden.	72

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen, die den Entstehungsprozess meiner Arbeit ermöglicht und begleitet haben herzlich bedanken.

Zunächst geht mein Dank daher an meinen Doktorvater Prof. Dr. Eberhardt Straube, dem ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit an seinem Institut wissenschaftliche Erfahrungen sammeln und publizieren zu dürfen, die guten Arbeitsbedingungen im Labor und das Interesse am Fortgang der Arbeit, danke.

Mein aufrichtiger Dank geht an Dr. Anke Hildebrandt, die immer ein verlässlicher und kompetenter Ansprechpartner war. Für ihre freundliche und unmittelbare Begleitung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit, die Unterstützung bei allen fachlichen theoretischen und praktischen Fragen, die investierte Zeit und das schnelle Hineindenken in meine Fragestellungen möchte ich mich bedanken.

Außerdem geht mein Dank an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Wolfram Dorn vom Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena, insbesondere an Dr. Jan Franke für die immer unkomplizierte, nette und verlässliche Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern des Institutes für medizinische Mikrobiologie der FSU Jena danke ich für die freundliche Zusammenarbeit während der praktischen Tätigkeiten im Labor und die Hilfestellung bei diesbezüglich organisatorischen Belangen.

Meinen Freunden danke ich für ihre Anteilnahme am Entstehen der Arbeit und insbesondere denen, die mir durch ihr Korrekturlesen konstruktive Kritik gegeben haben für ihre investierte Zeit und Mühe.

Sehr danken möchte ich Tim für die unterstützende Motivation, sein Verständnis, seine Geduld und Optimismus während des langen Entstehens meiner Arbeit.

Mein größter Dank allerdings gilt meinen Eltern und meinem Bruder Christoph für ihre immer liebevolle und bedingungslose Unterstützung - nicht nur die Promotion, sondern meinen gesamten bisherigen Lebensweg betreffend.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

Franke J, Fritzsche J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010. Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl Environ Microbiol*, 76(20):6829-36.

Hildebrandt A, Fritzsche J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2011. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:533-537.

Kongress- und Tagungsbeiträge:

Hildebrandt A, Fritzsche J, Franke J, Sachse S, Straube E. Interesting insights into the co-circulation of pathogens in *Ixodes ricinus* ticks from rodents, birds and in questing stages in Middle Germany. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10 - 13 April 2010, Vienna, Austria, Poster.

Franke J, Fritzsche J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. Co-circulation of pathogens in host-seeking and parasitizing *Ixodes ricinus* ticks in a natural habitat in Central Germany. 12th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases (ICLB) 2010, 26th-29th September 2010, Ljubljana, Slovenia, Poster and oral presentation.

Wissenschaftliche Arbeiten, in die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eingeflossen sind:

Franke J. 2010. Zur Bedeutung des Vektors *Ixodes ricinus* und verschiedener Wirtsspezies für die Verbreitung zeckenassoziiierter Krankheitserreger [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Hildebrandt A. 2011. Bedeutung des Vektors *Ixodes ricinus* und verschiedener Wirte im Transmissionszyklus zeckenassoziiierter Pathogene [Habilitation]. Jena: Institut für medizinische Mikrobiologie.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. E. Straube, Frau Dr. med. A. Hildebrandt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 14. Mai 2012